

**PHAGOZYTOSEAKTIVITÄT  
NACH IMPLANTATION  
BIORESORBIERBARER MATERIALIEN  
IN WACHSENDEN RATTEN**

**Diplomarbeit**

eingereicht von

**Katharina Angerpointner**

Geb.Dat.: 06.11.1987

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**Universitätsklinik für Kinderchirurgie, Graz**

unter der Anleitung von

**Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. Annelie-Martina Weinberg**

Graz, November 2012

Katharina Angerpointner

*Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, am 16.11.2012*

*Katharina Angerpointner*

*Es ist nicht genug, zu wissen, man muß auch anwenden;  
es ist nicht genug, zu wollen, man muß auch tun.*

*Johann Wolfgang von Goethe*

## *Danksagungen*

*Mein besonderer Dank für die Unterstützung  
bei der Erstellung meiner Diplomarbeit gilt:*

*Assoz. Prof. Priv.- Doz. Dr. med. Annelie-Martina Weinberg*

*Dr. med. univ. Karin Pichler*

*Mag. Elisabeth Martinelli*

*Dr. med. univ. Stefan Fischerauer*

*Dr. med. univ. Peter Ferlic*

*Ao. Univ. Prof. Dr. med. univ. Hans-Peter Brezinsek*

*Verena Krischan*

*Irene Holzer*

*DANKE!*

*Für Severin*

# **Zusammenfassung**

## ***Fragestellung:***

Das unspezifische Immunsystem wird durch chirurgische Eingriffe an Knochen und Weichteilen stimuliert. Bisher ist nicht untersucht worden, ob das unspezifische Immunsystem durch die Implantation bioresorbierbarer Materialien zur Frakturstabilisierung ebenfalls beeinflusst wird und in welcher Weise dies geschieht. Ziel dieser Studie ist es, diesen Einfluss anhand der Phagozytoseaktivität bei wachsenden Ratten zu beurteilen.

## ***Methodik:***

Insgesamt wurden in der Studie 18 wachsende Ratten prospektiv untersucht. Diese wurden randomisiert in 3 Gruppen zu je 6 Tieren eingeteilt. In der Versuchsgruppe B wurden die Tiere operativ mit einem transkortikalen Bohrloch durch die Mitte des Femurschafts und einem Implantat aus Polyhydroxybutyrat + 3% Zirkonium versorgt. Die Behandlung der Ratten in der Kontrollgruppe C beschränkte sich auf das transkortikale Bohrloch durch den Femurschaft. Die Tiere der Shamgruppe S mussten sich keinem Eingriff unterziehen. Die Blutproben wurden vor der Operation sowie in den ersten 3 postoperativen Wochen wöchentlich abgenommen. Mittels Phagotest® wurde dann die Phagozytoseaktivität bestimmt.

## ***Ergebnisse:***

Die Ausgangswerte vor der Operation waren in allen 3 Gruppen homogen. Nach einer Woche zeigte sich eine signifikant niedrigere Phagozytoseaktivität in den Gruppen C (56%) und B (41,1%) im Vergleich zur Gruppe S (68,5%), wobei die niedrigsten Werte in der Gruppe mit einem bioresorbierbaren Implantat beobachtet wurden. Nach zwei Wochen stiegen die Werte der Gruppen C (79%) und B (69,3%) signifikant über die Werte der Gruppe S (60,8%) an. Zwischen Gruppe C und Gruppe B zeigten sich im gesamten Verlauf keine statistisch signifikanten Unterschiede. Nach 3 Wochen glichen sich die Werte in allen drei Gruppen wieder aneinander an. In der Sham-Gruppe fand sich während des gesamten Zeitraums keine signifikante Veränderung der Phagozytoseaktivität.

**Schlussfolgerungen:**

Operationsbedingtes Weichteiltrauma und knöcherner Verletzung, aber auch das Material des bioresorbierbaren Implantats beeinflussen in den ersten postoperativen Wochen das unspezifische Immunsystem. Dieser Einfluss kann anhand der Phagozytoseaktivität quantifiziert werden. Da sich die Werte der Gruppen C und B im gesamten Studienverlauf nicht signifikant voneinander unterscheiden, schließen wir daraus, dass PHB keine zusätzliche Beeinträchtigung für das Immunsystem darstellt und daher ein geeignetes bioresorbierbares Implantatmaterial ist.

**Schlüsselwörter:**

Phagozytoseaktivität, wachsende Ratte, Bioresorbierbare Implantate, Immunsystem

## **Abstract**

### ***Introduction:***

Besides trauma done to bones and soft-tissues during surgery, it must be assumed that also degradable biomaterials implanted for fracture fixation have an impact on the function of immune cells. The aim of this study is to evaluate the influence of degradable biomaterials implanted into the femur of growing rats on the innate immune system.

### ***Methods:***

18 growing rats were examined in this prospective study. They were randomly divided into 3 groups with 6 rats each. Animals in the experimental group B received a transcortical drill-hole through the right femoral shaft and a bioresorbable implant made out of Polyhydroxybutyrate + 3% Zirconium. The treatment of the rodents in control group C was limited to the transcortical drill-hole. The animals in sham-group S did not undergo any surgical procedure. Blood samples were taken before surgery and weekly for the first 3 postoperative weeks. Phagocytic activity was evaluated with Phagotest ®.

### ***Results:***

Before surgery the values of phagocytic activity of all 3 groups were similar to each other. One week after surgery a significant decrease of phagocytic activity appeared in group C and B compared with group S, whereas lowest levels were observed in the group with implants. After two weeks the values of group B and C increased significantly above the level of group S. Between group C and group B we recognized no significant differences during the whole study. After three weeks the phagocytic activity levels of all groups were approaching again. No significant change in phagocytic activity appeared in group S during the whole experimental period.

### ***Conclusion:***

Soft-tissue trauma due to surgery and bone lesions but also biodegradable implant materials influence the innate immune system during the first postoperative weeks. This influence could be quantified using phagocytic activity. Due to the fact that

there is no significant difference between the values of group C and group B, we conclude that PHB does not affect the immune system additionally and is therefore a suitable material for biodegradable implant application.

***Key words:***

Phagocytic activity, growing rat, bioresorbable implants, immune system

# Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG .....	1
2	ANGEBORENES IMMUNSYSTEM .....	2
2.1	Phagozyten .....	3
2.1.1	Monozyten .....	4
2.1.2	Neutrophile Granulozyten .....	4
2.1.3	Phagozytoseaktivität .....	6
2.2	Komplementsystem .....	11
3	BIORESORBIERBARE MATERIALIEN.....	12
3.1	Hintergrund-“state of the art“ .....	12
3.2	Polyhydroxybuttersäure (PHB) .....	13
4	LOKALE FREMDKÖRPERREAKTION.....	14
5	ZIEL DER STUDIE .....	15
6	MATERIAL UND METHODEN.....	16
6.1	Studiendesign .....	16
6.2	PHB-Implantate.....	16
6.3	Tierversuche .....	17
6.3.1	Anästhesie .....	18
6.3.2	Operative Implantation.....	19

6.3.3 Postoperatives Management .....	21
6.3.4 Blutabnahmen .....	22
6.4 Laboruntersuchungen .....	23
6.4.1 Phagotest ® .....	23
6.4.2 Geräte und Software .....	24
6.5 Graphisch quantitative Auswertung .....	24
6.6 Statistische Auswertung .....	26
7 ERGEBNISSE .....	28
7.1 Graphische Auswertung .....	28
7.2 Statistische Auswertung .....	32
8 DISKUSSION.....	40
9 SCHLUSSFOLGERUNG .....	42
LITERATURVERZEICHNIS .....	43
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	47
TABELLENVERZEICHNIS.....	48

# Abkürzungen

<b>BPI</b>	Bactericidal/Permeability Increasing Protein = bakterizides permeabilisierendes Protein
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation
<b>CTLR</b>	C-Typ Lektin Rezeptor
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleic Acid = Desoxyribonukleinsäure
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>FSC</b>	Forward-Scatter = Vorwärts-Streulicht
<b>G-CSF</b>	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
<b>IBF</b>	Institut für Biomedizinische Forschung
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IL</b>	Interleukin
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>M-CSF</b>	Macrophage Colony-Stimulating Factor
<b>MAC</b>	Membranangriffskomplex
<b>MBL</b>	Mannose-bindendes Lektin
<b>MUG</b>	Medizinische Universität Graz
<b>NADPH</b>	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
<b>NF</b>	Nukleärer Faktor
<b>NLR</b>	NOD-like Rezeptor
<b>NOD</b>	Nucleotide-binding and Oligomerization Domain
<b>PAF</b>	Plättchenaktivierender Faktor

<b>PAMPs</b>	Pathogen Associated Molecular Patterns
<b>PG</b>	Prostaglandin
<b>PGA</b>	Poly-Glycolic-Acid = Polyglykolsäure
<b>PHB</b>	Polyhydroxybuttersäure/-butyrat
<b>PLLA</b>	Poly-L-Lactic Acid = Poly-L-Milchsäure
<b>PRRs</b>	Pattern Recognition Receptors
<b>RIG-I</b>	Retinoic acid inducible gene-I
<b>RLR</b>	RIG-Like Rezeptor
<b>RNA</b>	Ribonucleic Acid = Ribonukleinsäure
<b>RNS</b>	Reactive Nitrogen Species = Reaktive Stickstoffmetaboliten
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species = Reaktive Sauerstoffmetaboliten
<b>SOD</b>	Superoxid Dismutase
<b>SSC</b>	Side-Scatter = Seitwärts-Streulicht
<b>TGF</b>	Transforming Growth Factor
<b>TLR</b>	Toll-like Rezeptor
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>TU</b>	Technische Universität

# 1 EINLEITUNG

Der Bedarf an Implantaten für Osteosynthesen in der Kindertraumatologie steigt stetig (1). Gründe dafür sind sowohl die bessere Möglichkeit zur kinderspezifischen medizinischen Versorgung als auch der positive Einfluss auf sozioökonomische Faktoren durch schnellere Rehabilitation und Schul-/Arbeitsfähigkeit. Die operative Frakturbehandlung im Kindesalter stellt allerdings neben physischer und psychischer Belastung des jungen Patienten und seiner Eltern auch für den behandelnden Arzt eine Herausforderung dar. Das wachsende Skelett unterliegt einem stetigen Wandel, dessen Mechanismen nicht vollständig geklärt sind. Störungen des Knochenwachstums durch Traumata können zu Wachstumsstörungen mit bleibenden Deformitäten führen. Die ungestörte Entwicklung des kindlichen Bewegungsapparates steht im Vordergrund, um später möglichen Einschränkungen durch Fehlstellungen und eventuell weiteren Korrekturoperationen vorzubeugen. Die Entwicklung spezieller Implantate für Kinder und geeigneter Zugänge zum schonenden Einbringen dieser, hat vor allem dazu geführt, dass sich der Krankenhausaufenthalt der Patienten erheblich verkürzt. Ziel der kinderspezifischen Behandlung muss daher sein, mit möglichst geringem Aufwand den größtmöglichen Erfolg und damit eine rasche Regeneration zu erzielen. Das heißt möglichst wenig Operationen und Narkosen, möglichst wenig Störungen des Heilungsprozesses und Reduktion der möglichen Komplikationen. Neben den medizinischen Vorteilen führt dieses Vorgehen schließlich auch zu einem sozioökonomischen Benefit durch kurze stationäre Aufenthalte und schnelle Wiedereingliederung in das gewohnte Umfeld, wobei Fehlzeiten in der Schule genauso reduziert werden können wie der Arbeitsausfall betreuender Elternteile (2). In den vergangenen Jahren hat sich die Verwendung bioresorbierbarer Implantate in unterschiedlichen Fachbereichen der Medizin mehr und mehr etabliert (3,4). Bei der Verwendung von bioresorbierbaren Implantaten in der Kindertraumatologie wäre ein Zweiteingriff zur Implantatentfernung, wie bei metallischen Implantaten üblich, obsolet. Außerdem zeichnen sich bioresorbierbare Implantate durch eine höhere Kompatibilität zum Frakturheilungsprozess aus (5). Durch den linearen Abbau der Implantate wird die Belastung langsam auf den Knochen übertragen und die natürliche Knochenheilung unterstützt. Im besten Fall könnten diese den Heilungsprozess

sogar aktiv anregen. Ausschlaggebend ist in jedem Fall die optimale Anpassung der Implantatmaterialien an den wachsenden Knochen. Die ideale Kombination aus Flexibilität und Stabilität ist dabei genauso wichtig wie die Minimierung von Nebenwirkungen wie Entzündungsreaktionen, Heilungsstörungen und Toxizität. Die bioresorbierbaren Implantate sollen die Frakturheilung bestmöglich unterstützen und zugleich eine zusätzliche Operation zur Metallentfernung unnötig machen. Dabei soll das Immunsystem so wenig wie möglich beeinflusst werden. Implantate sind immer Fremdkörper, deren Abbauprodukte vom Organismus verstoffwechselt werden und lösen dadurch Immunreaktionen aus. Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von bioresorbierbaren Implantaten aus Polyhydroxybutyrat (PHB) auf das Immunsystem zu untersuchen. Hierfür wurde ein spezifischer immunologischer Test im Rattenmodell etabliert. Dieser misst, ob sich die Aktivität der Phagozyten nach Implantation eines Pins aus PHB im Blut der wachsenden Ratte verändert und quantifiziert so die Antwort des unspezifischen Immunsystems.

## **2 ANGEBORENES IMMUNSYSTEM**

Zur Abwehr von Antigenen wie Krankheitserregern, Giftstoffen oder Fremdmaterialien, die etwa durch Verletzungen und operative Eingriffe in den Körper gelangen, macht sich der Organismus zwei eng miteinander in Kontakt stehende Systeme zu Nutze. Sowohl unspezifische, schnell wirksame, als auch spezifisch auf die Beschaffenheit der eingedrungenen Substanzen abgestimmte Vorgänge laufen in ständiger Wechselwirkung miteinander ab, um die Integrität des Organismus aufrecht zu erhalten. Dabei steht vor allem die Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Stoffen im Vordergrund. Das erworbene Immunsystem hat die Aufgabe, gezielt Fremdstoffe zu bekämpfen, muss aber im Laufe der Entwicklung erst vollständig ausgebildet werden. Für unspezifische Abwehrreaktionen ist das angeborene Immunsystem zuständig. Dieses ist schon von Geburt an aktiv und funktioniert vorwiegend mittels Phagozytose (6). Das angeborene Immunsystem stellt die erste Instanz in der Abwehr von Antigenen dar, wenn diese die als natürliche Resistenz geltenden Barrieren des Körpers, wie intakte Haut und Schleimhäute, überwunden haben.

Zur Aktivierung ist im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem kein vorhergehender Antigenkontakt nötig. Daher sind die Abwehrmechanismen sofort einsatzfähig und die Reaktion kann innerhalb kürzester Zeit erfolgen. Eine Adaptation an bestimmte Antigene und die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses bleiben allerdings aus. Zusätzlich zur Abwehrfunktion hat das angeborene Immunsystem auch die wichtige Aufgabe, das adaptive Immunsystem zu aktivieren, wenn dieses benötigt wird. In den meisten Fällen genügt schon der Einsatz des angeborenen Immunsystems um die Pathogene zu beseitigen und einen Krankheitsausbruch zu verhindern (7). Die Zellen des unspezifischen Immunsystems erkennen Erreger und andere körperfremde Moleküle an bestimmten gruppenspezifischen Oberflächenmerkmalen, den so genannten „Pathogen Associated Molecular Patterns“ (PAMPs). PAMPs sind zum Beispiel Lipopolysaccharide (LPS) in der Zellwand Gram-negativer Keime, Peptidoglycane von Gram-positiven Bakterien oder bakterielle und virale Nukleinsäuren. Dadurch ist die Immunreaktion nicht erregerspezifisch, deckt aber ein breites Spektrum verschiedener Antigene ab. Zur Erkennung der PAMPs dienen spezielle keimbahncodierte Rezeptoren an den Effektorzellen des unspezifischen Immunsystems, die so genannten „Pattern Recognition Receptors“ (PRRs) (8,9). Zu den zellulären Bestandteilen des angeborenen Immunsystems gehören neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, Monozyten und ihre ausgereifte Form, die Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen und natürliche Killerzellen. Ergänzt wird die zelluläre Komponente des unspezifischen Immunsystems durch humorale Stoffe wie Komplementfaktoren, Akute-Phase-Proteine, Interferone, Lysozym und ähnliche antibakterielle Enzyme, die im Plasma gelöst sind (8,10-14).

## **2.1 Phagozyten**

Phagozyten sind die Fresszellen des unspezifischen Immunsystems (gr. phagein = fressen, cytos = Zelle). Sie wurden zum ersten Mal 1883 vom russischen Zoologen Ilija Iliitsch Metchnikow beschrieben. Die Phagozytose ist der älteste bekannte Abwehrmechanismus und die grundlegende Funktion des angeborenen Immunsystems (12,14). Phagozyten sind in der Lage, Mikroorganismen und andere körperfremde Teilchen, die die Epithelbarriere des Organismus

überwunden haben, zu erkennen, in sich aufzunehmen und zu zerstören (8). Zu den Phagozyten gehören Monozyten, deren gewebständige Form, die Makrophagen und neutrophile Granulozyten.

### **2.1.1 Monozyten**

Monozyten zirkulieren im Blut und stellen die Vorstufe der gewebständigen Makrophagen dar. Sie entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Durch Stimulation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren wie dem Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) und dem Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF) differenzieren sie sich von der myeloiden Vorläuferzelle über die Vorstufen Monoblast und Promonozyt zu reifen Monozyten. Nach Auswanderung ins Gewebe entstehen daraus die Makrophagen (siehe Abbildung 1) (13). Diese haben durch ihren Sitz im Gewebe als erstes Kontakt zu eingedrungenen Pathogenen und locken durch Produktion von Chemokinen Monozyten und neutrophile Granulozyten an den Entzündungsort. Die wichtigsten Funktionen der Monozyten sind Phagozytose und oxidativer Burst, um Pathogene oder Gewebereste zu verdauen, Produktion von Entzündungsmediatoren zur Immunmodulation (v.a. Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, Tumornekrosefaktor (TNF)  $\alpha$ ) und Antigenpräsentation, um das adaptive Immunsystem zu aktivieren. Damit stellen die Monozyten ein bedeutendes Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dar (8). Um die Erkennung und Aufnahme von Pathogenen in das Zellinnere zu ermöglichen, besitzen Monozyten eine Reihe von Rezeptoren an der Zelloberfläche. Dazu gehören der CD14-Rezeptor für LPS, Rezeptoren für Komplementspaltprodukte (CR1/CD35, CR3/CD11b) und für Immunglobulin (Ig) G (CD16, CD32, CD64) (13).

### **2.1.2 Neutrophile Granulozyten**

Neben Monozyten und Makrophagen sind auch die neutrophilen Granulozyten wichtiger Bestandteil der Phagozytenpopulation. Vergleichbar mit den Monozyten entstehen sie aus dem gemeinsamen Vorläufer, der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle. Über die myeloische Vorläuferzelle entwickeln sich unter dem Einfluss von GM-CSF und Granulocyte Colony-Stimulating Factor

(G-CSF) Myeloblasten, neutrophile Promyelozyten und schließlich ausdifferenzierte neutrophile Granulozyten (siehe Abbildung 1) (13). Im Zellinneren befinden sich zahlreiche Granula. Die primären, azurophilen Granula entsprechen den Lysosomen und enthalten Myeloperoxidase, Lysozym, Elastase, Cathepsin G, saure Hydrolasen, bakterizide permeabilitätssteigernde Proteine (Bactericidal/Permeability Increasing Protein, BPI) und Defensine. Die sekundären spezifischen Granula enthalten keine Myeloperoxidase aber neben Lysozym, alkalischer Phosphatase und membrangebundenem Cytochrom b558 auch Lactoferrin und Vitamin B12 bindendes Protein (14,15). Daneben existieren tertiäre Gelatinase-Granula. Diese dienen als Speicher für Metalloproteinasen wie Gelatinase und Leukolysin (15). Typischerweise haften die Zellen selektiv vermittelt locker an Gefäßwänden und rollen an diesen entlang. Von chemotaktischen Reizen seitens eines Infektionsherdes angezogen, gehen sie über Integrine eine stärkere Bindung mit den Endothelzellen der peripheren Gefäße ein und beginnen die Gefäßwand und das Bindegewebe zu durchwandern, um direkt am Ort des Geschehens mit der Pathogenabwehr zu beginnen (16). Neben Phagozytose und der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zur Bekämpfung von Pathogenen haben neutrophile Granulozyten auch eine wichtige Vermittlerfunktion im Immunsystem. Über verschiedene Zytokine und Mediatoren treten sie in Kontakt mit Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems und sorgen damit für adäquate Bedingungen, um eine Immunreaktion suffizient ablaufen zu lassen (15).

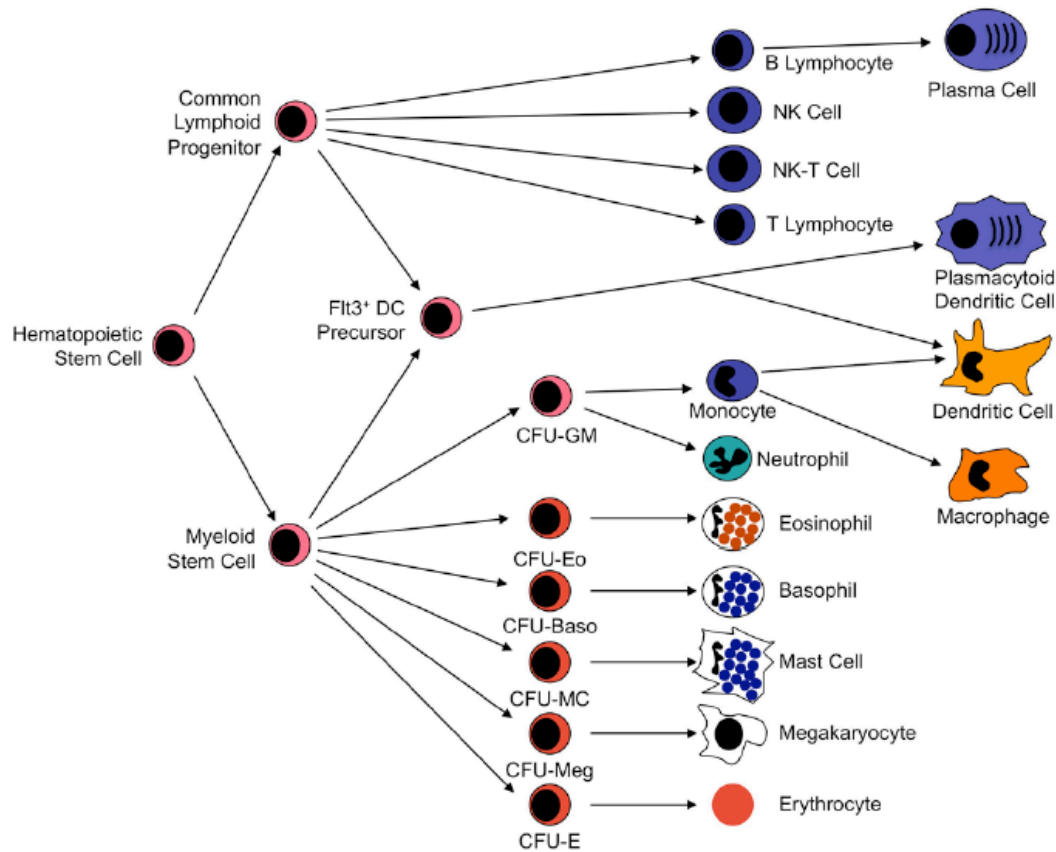


Abbildung 1: Übersicht über die Immunzellentwicklung, aus (6)

### 2.1.3 Phagozytoseaktivität

Die Phagozytose gehört zu den wichtigsten Abwehrmechanismen des menschlichen Organismus um körperfremde Stoffe ebenso wie körpereigene Zellbestandteile oder Tumorzellen zu beseitigen. Durch aktive Prozesse wird ein rezeptorgebundenes Pathogen von der Phagozytenmembran umschlossen und als Phagosom in die Zelle eingeschleust. Durch Änderung des pH-Werts und antimikrobielle Stoffe aus den Granula bzw. Lysosomen der Phagozyten können die aufgenommenen Pathogene unschädlich gemacht und abgebaut werden. Im Zuge der Phagozytose haben Fresszellen außerdem die Möglichkeit, die phagozytierten Erreger durch reaktive Sauerstoffmetaboliten abzutöten (8). Die genauen Vorgänge während der Phagozytose werden anschließend erläutert (siehe Abbildung 2).

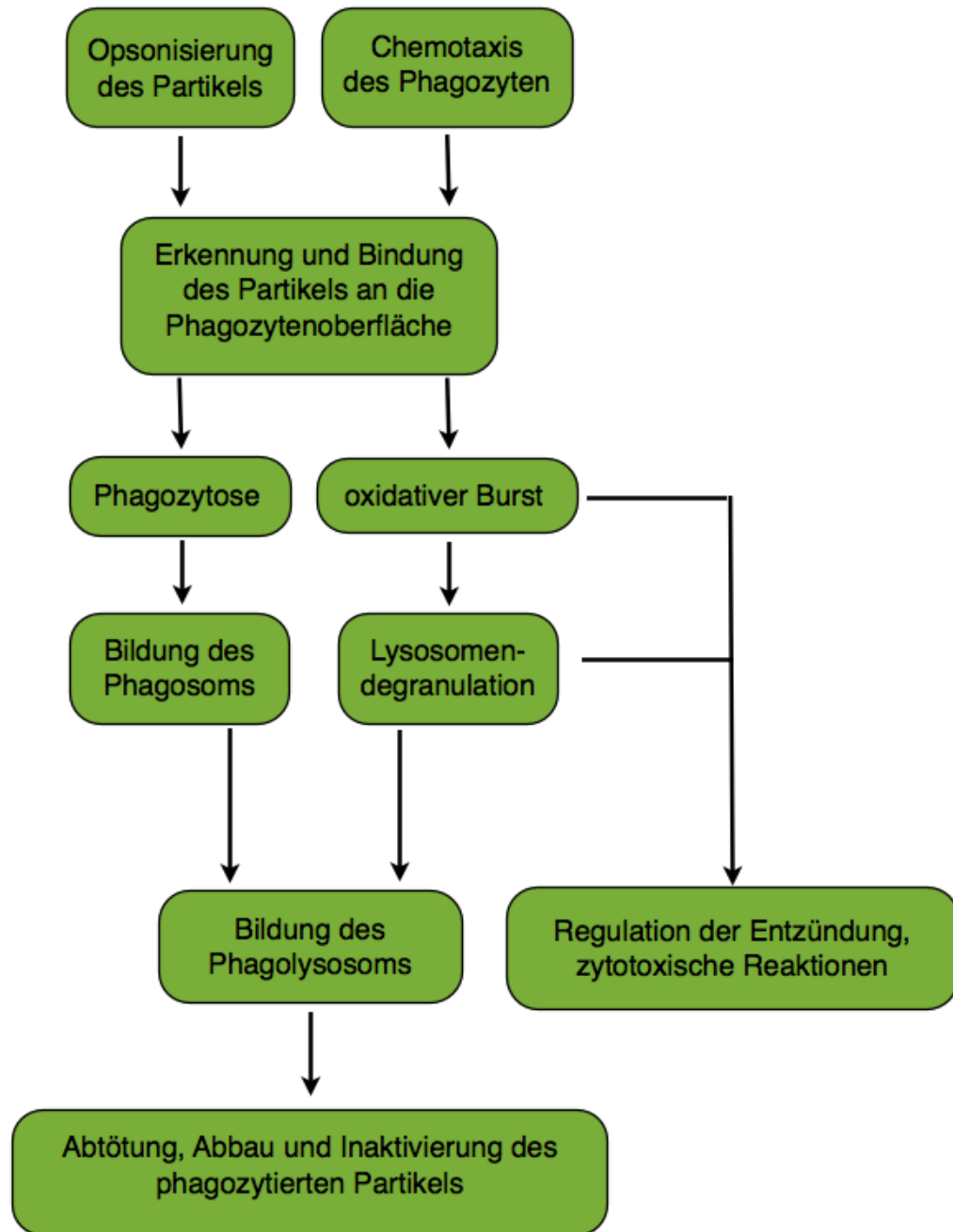


Abbildung 2: Ablauf der Phagozytose, nach (12)

### Chemotaxis und Pathogenerkennung

Als Reaktion auf Traumata werden sowohl von beschädigten Endothelzellen als auch von aktiven Phagozyten selbst chemotaktische Mediatoren wie IL-1, IL-8,  $\text{TNF}\alpha$  und Plättchenaktivierender Faktor (PAF) produziert und ausgeschüttet. Auch Leukotrien B4 und der Komplementfaktor C5a zählen zu den chemotaktisch wirksamen Faktoren. Diese aktivieren weitere Phagozyten und locken sie

entgegen ihres Konzentrationsgefälles zum Entzündungsherd (17). Dort angekommen erkennen die Phagozyten vorhandene Pathogene anhand deren PAMPs mittels oberflächlich exprimierten PRRs. Diese Rezeptoren lassen sich anhand ihrer Lokalisation und Funktion in verschiedene Klassen unterteilen (8,14). Zu den membranständigen Rezeptoren gehören Scavenger-Rezeptoren und C-Typ Lektin Rezeptoren (CLR) als direkte Phagozytoserezeptoren und außerdem Toll-like Rezeptoren zur Signalübertragung. Die Scavenger-Rezeptoren erkennen unterschiedliche anionische Polymere und vor allem LPS Gram-negativer Bakterien mittels CD14-Molekülen. Dadurch schaffen sie die Voraussetzungen für die Phagozytose und aktivieren den Toll-like Rezeptor 4. Die kalziumabhängigen CLR, zu denen der Mannose-Rezeptor der Makrophagen gehört, sind als Transmembranproteine in der Lage, verschiedene Kohlenhydratgruppen auf der Zelloberfläche von Keimen zu erkennen und lösen durch deren Bindung die Aktivierung der Zelle und damit die Phagozytose des Pathogens aus (14). Die wohl bedeutendste Gruppe der PRRs stellen die sogenannte Toll-like Rezeptoren (TLR) dar. Nach dem Toll-Rezeptor der Fruchtfliege *Drosophila Melanogaster* benannt, sind beim Menschen mittlerweile elf TLRs und deren Funktion bekannt. Die Rezeptoren sind entweder auf der Zelloberfläche oder auf der Oberfläche von Endosomen lokalisiert. Auf der Zelloberfläche werden sie beispielsweise von Peptidoglycan, Lipoproteinen und Flagellin aktiviert. Die TLRs auf den Endosomen (TLR 3, 7, 8, 9) sind für virale Ribonukleinsäure (RNA) und unmethylierte bakterielle Desoxyribonukleinsäure (DNA) verantwortlich (18). Auf die Pathogenbindung folgt über intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden die Expression von Transkriptionsfaktoren (v.a. Nukleärer Faktor (NF)  $\kappa$  B) und die Aktivierung der Immunzellen. TLRs sind keine direkten Phagozytoserezeptoren sondern nur für die Signalübertragung zuständig (8). Neben den membranständigen Rezeptoren existieren folgende PRRs im Zellinneren: Retinoic acid inducible gene-1 (RIG)-like Helikaserezeptoren (RLR) sind auf die intrazelluläre Erkennung viraler Bestandteile spezialisiert und werden von doppelsträngiger RNA aktiviert. In weiterer Folge induzieren sie die Bildung von antiviralen Interferonen (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ). Auch Nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like Rezeptoren (NLR) befinden sich zur intrazellulären Erkennung von Bakterien als lösliche Proteine im Zytoplasma. Durch die Expression von Transkriptionsfaktoren werden die Immunzellen aktiviert

und zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen angeregt (14,18). Zusätzlich zu den oben genannten PRRs sind auch eine Reihe humoraler Stoffe für die Pathogenerkennung verantwortlich. Diese opsonisieren Pathogene und erleichtern somit die Rezeptorbindung an Phagozyten. Dazu gehört beispielsweise das Mannose-bindende Lektin (MBL) im Blutplasma. Haben Bakterien an ihrer Oberfläche Zuckerreste in bestimmter räumlicher Anordnung, werden diese von MBL erkannt, gebunden und damit opsonisiert. Gleichzeitig wird der sogenannte Lektin-Weg der Komplementkaskade aktiviert (8). Auch die Komplementfaktoren, wie C3b und Surfactant-Protein A, sind Bestandteile dieser humoralen Pathogenerkennung. Antikörper nehmen eine Sonderstellung in dieser Kategorie ein. Sie verbinden die angeborene mit der erworbenen Immunantwort. Den Antikörpern der erworbenen Immunität wird die sehr spezifische Pathogenerkennung zugeordnet, deren Komplexe binden dann aber an Fc-Rezeptoren auf Zellen des angeborenen Immunsystems (19).

### **Pathogenaufnahme/Ingestion**

Wurde ein Pathogen von einem Phagozyten erkannt, folgt die Aufnahme ins Zellinnere. Komplexe Signalübertragungswege resultieren in einem Umbau des aktinbasierten Zytoskeletts. Dadurch dehnt sich die Zellmembran aus. Sie bildet Pseudopodien, welche den Fremdkörper am Rezeptor umschließen und somit als Vesikel (Phagosom) ins Zellinnere aufnehmen (14,17,19). Um die eigentliche Phagozytoseleistung, also die Aufnahme von Mikroorganismen in die Zelle zu bestimmen, wird der so genannte Phago-Test® (Orpegen Pharma) verwendet (Siehe 6.4.1).

### **Pathogenabbau**

Im Zellinneren verschmelzen Phagosom und Lysosomen/Granula miteinander und werden nun als Phagolysosom bezeichnet. Diese Verbindung setzt die verschiedenen Abbauprozesse der Phagozyten in Gang. Dabei handelt es sich um sauerstoffabhängige und sauerstoffunabhängige Mechanismen. Sauerstoffunabhängig basieren die Vorgänge auf antimikrobiellen Stoffen, die in den Lysosomen und Granula gespeichert sind (Siehe 2.1.2) und im Phagolysosom mit dem eingeschlossenen Pathogen in Kontakt kommen. Die

sauerstoffabhängigen Mechanismen zeichnen sich durch Bildung von ROS und reaktiven Stickstoffmetaboliten (RNS) aus. Als oxidativer Burst wird die Entstehung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten in einer Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH)-Oxidase und Cytochrom b 558 vermittelten Reaktion bezeichnet, da hier der Sauerstoffverbrauch der Phagozyten erheblich gesteigert wird (8). Durch Aktivitätszunahme im Pentosephosphatweg wird reduziertes NADPH gebildet, welches Elektronen über einen Zwischenschritt an Cytochrom b558 weitergibt. In folgender Reaktion wird molekularer Sauerstoff (O<sub>2</sub>) direkt zu Superoxidanionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) oxidiert:



Mittels Superoxid-Dismutase (SOD) wird aus O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gebildet. In der Haber-Weiss-Reaktion (21) reagiert dann H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit Eisenionen (Fe<sup>2+</sup>) zu Hydroxyl-Anionen (OH<sup>-</sup>) und Hydroxyl-Radikalen (•OH), welche als hoch reaktive freie Radikale gelten. In Verbindung mit Chlorid-Ionen (Cl<sup>-</sup>) und dem Einfluss von Myeloperoxidase entsteht Hypochlorit (OCl<sup>-</sup>) bzw. Hypochlorsäure (HOCl) (8,14,16). Generell zeigen alle ROS toxische Aktivität gegenüber Mikroorganismen, sie unterscheiden sich aber in Wirkungsstärke und Angriffsmechanismus. O<sub>2</sub><sup>-</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> haben nur eine beschränkte antimikrobielle Wirkung und dienen hauptsächlich als Grundlage zur Bildung von aggressiveren ROS. Das Hydroxyl-Radikal hingegen ist äußerst aktiv und führt zu DNA-Veränderungen, Strangbrüchen und Inaktivierung von Enzymen. HOCl ist zwar kein freies Radikal, aber dennoch sehr reaktiv (siehe Abbildung 3) (22).

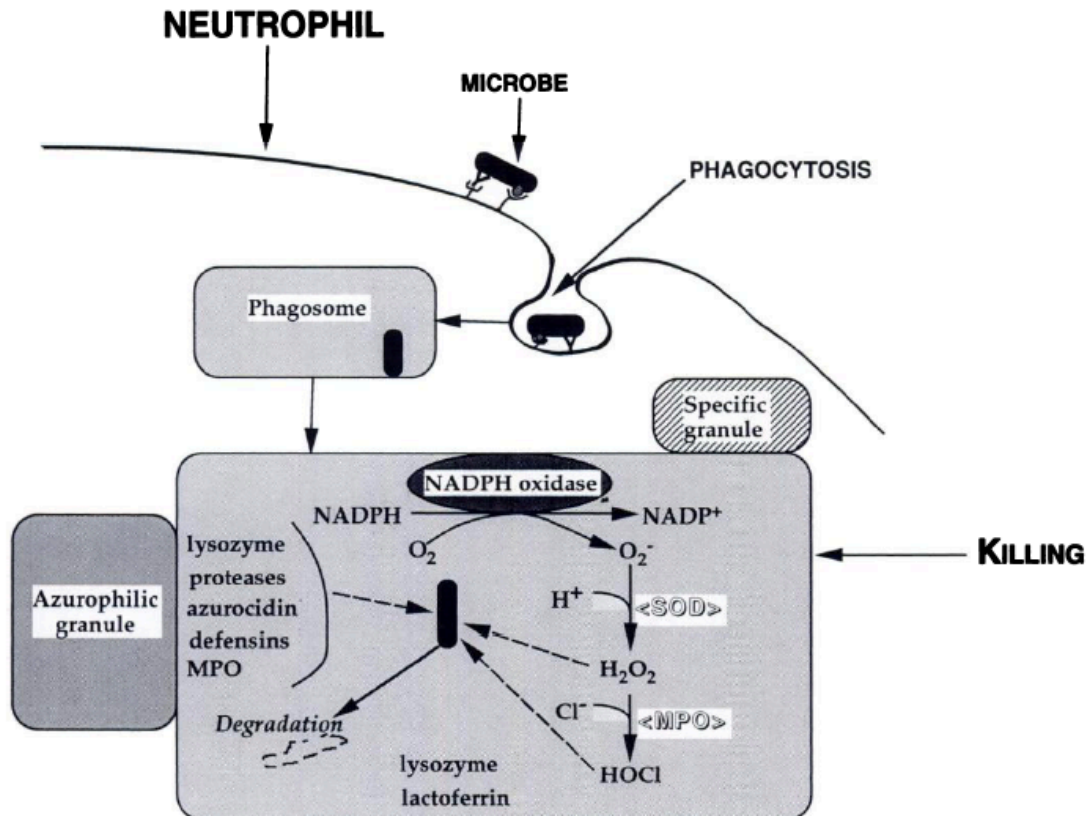


Abbildung 3: Phagozytose und oxidativer Burst, aus (16), Details siehe Text

## 2.2 Komplementsystem

Das Komplementsystem ist neben der zellulären Komponente der wichtigste Bestandteil des angeborenen Immunsystems zur Bekämpfung von Fremdstoffen. Bestehend aus einer Vielzahl verschiedener Plasmaproteine, welche sich durch Proteolyse kaskadenartig gegenseitig spalten und somit aktivieren, dient das Komplementsystem hauptsächlich der Opsonisierung von Pathogenen und erleichtert somit deren Phagozytose. Daneben können Pathogene von Komplementfaktoren auch direkt lysiert werden. Fragmente von Komplementfaktoren funktionieren als chemotaktische Faktoren und locken Immunzellen an (14). Drei verschiedene Aktivierungswege haben als gemeinsamen zentralen Schritt die Spaltung des Komplementfaktors C3 in C3a und C3b durch die C3-Konvertase. C3b bindet entweder direkt an Fremdstoffe (Opsonisierung) oder bildet zusammen mit der C3-Konvertase die C5-Konvertase. Diese spaltet den Faktor C5 wiederum in C5a und C5b. C5b bindet schließlich an eine Zielzelle und stellt die Grundlage für die Bildung des

Membranangriffskomplexes (MAC) dar. Der MAC entsteht aus der Kombination von C5b mit den Komplementfaktoren C6, C7, C8 und C9 (12). Die damit verbundene Porenbildung in der Zellmembran führt durch den hohen intrazellulären kolloidosmotischen Druck zu einem Einstrom von Natrium und Wasser und schließlich zur Lyse der Zielzelle (14).

### **3 BIORESORBIERBARE MATERIALIEN**

#### **3.1 Hintergrund-“state of the art“**

Nach aktuellem Stand der Forschung kennt man folgende bioresorbierbare Materialien: metallische Verbindungen auf Eisen- und Magnesiumbasis (23,24) oder Polymere aus Biomaterialien. Die Polymer-Implantate werden in vivo in ihre Monomere zerlegt und können dadurch abgebaut werden. Die Ketten werden in Verbindung mit Wasser durch Hydrolyse gespalten, die Bruchstücke von Makrophagen phagozytiert und in den Zitronensäurezyklus eingeschleust (3). Bisher wurden vor allem Polymere aus alpha-Hydroxysäuren wie Poly-L-Milchsäure (Poly-L-Lactic Acid, PLLA) und Polyglykolsäure (Poly-Glycolic-Acid, PGA) oder deren Copolymere erfolgreich eingesetzt (3,25). Als Alternativen dazu wurden auch Polyglyconate, PHB, Polyorthoester und Polypeptide auf Tyrosinbasis verwendet (26). Publiziert wurde die Verwendung von bioresorbierbaren Implantaten bei Kindern bisher von Hope et al. (27) zur Stabilisierung von Ellenbogenfrakturen und von Eppley et al. (28) in der Gesichtschirurgie. In der Kindertraumatologie und -orthopädie sind solche Publikationen insgesamt jedoch selten. Die Vorteile der bioresorbierbaren Implantate sind vor allem die fehlende zweite Operation zur Implantatentfernung und die bessere Kompatibilität zum Frakturheilungsprozess, verglichen mit konventionellen nicht-resorbierbaren Implantaten (5). Daneben werden in der Literatur auch Nachteile der verschiedenen Materialien beschrieben. Toxische Reaktionen konnten durch strenge Produktionskontrollen minimiert werden. Allergische Reaktionen (29) und Immunreaktionen (29,30) bleiben als Hauptkomplikationen bestehen. Mit einem Auftreten in bis zu 90% der Fälle (26,31) sind dabei Immunreaktionen auf bioresorbierbare Materialien die häufigste Komplikation. Diese manifestieren sich als Weichteilschwellung in der Umgebung

des Implantats (3,5) oder als Knochenresorption mit folgender Implantatlockerung (3,32). Als ungünstig erwies sich auch die fehlende Röntgendichte der Polymere, wodurch sie bei Röntgenuntersuchungen nicht sichtbar sind. Aus diesem Grund werden Füllsubstanzen wie beispielsweise Zirkoniumoxid beigemischt (4,33).

### **3.2 Polyhydroxybuttersäure (PHB)**

Das mikrobielle Polyester PHB ist der einfachste Vertreter der Polyhydroxyalkanoate und wurde 1926 von Maurice Lemoigne entdeckt (34). Durch Fermentation wird PHB in Mikroorganismen produziert und als Granula gespeichert. Aus diesen wird es dann für die Weiterverarbeitung isoliert (35). Heutzutage gilt PHB durch die Feinsteuerbarkeit seiner Eigenschaften für den Einsatz als Implantat Erfolg versprechender als die in der Vergangenheit getesteten Biopolymere aus Polymilchsäure (36). Durch optimierte biotechnologische Verfahren zur Herstellung des Rohstoffes konnte der Endotoxingehalt wesentlich verringert werden (37). Dadurch reduzierten sich auch die damit verbundenen Entzündungsreaktionen erheblich. Zusätzlich zur Bioresorbierbarkeit ist PHB nicht-cytotoxisch, gut sterilisierbar und biokompatibel, das heißt es erfüllt die gewünschte Funktion im Sinne einer medizinischen Therapie ohne dabei unerwünschte lokale oder systemische Auswirkungen im Organismus hervorzurufen, sondern unterstützt ihn gleichwohl mit der bestmöglichen Zell-/Gewebeantwort bei der Heilung (38). Somit erfüllt es die Voraussetzungen für den medizinischen Gebrauch (39).

## 4 LOKALE FREMDKÖRPERREAKTION

Die lokale Fremdkörperreaktion ist eine der unerwünschten Auswirkungen auf den Organismus. Die folgenden drei Mechanismen können als Auslöser fungieren: Zum einen können körpereigene Proteine durch Kontakt mit dem eingebrachten Kunststoff denaturieren und damit eine Immunreaktion auslösen. Zum anderen haben freiliegende körperfremde Oberflächen, welche nicht mit Proteinen überlagert sind, einen direkten Einfluss auf das Immunsystem. Als drittes stellen bestimmte Abbauprodukte von Biomaterialien antigene Strukturen dar und rufen dadurch eine Immunantwort hervor (40). Nach Hoffmann et al. (1997) können lokale Fremdkörperreaktionen auf biodegradierbare Implantate in ossäre Reaktionen, extraartikuläre Weichteilreaktionen und intraartikuläre, synoviale Weichteilreaktionen mit jeweils vier Schweregraden eingeteilt werden (41). Die ossären Reaktionen manifestieren sich als Osteolysen rund um das Implantat. Dessen Abbauprodukte führen zur Resorption von umliegendem Knochengewebe. Von milden, nur radiologisch sichtbaren Läsionen reichen die verschiedenen Schweregrade bis hin zu drastischen Veränderungen, welche die Frakturheilung stören (41). Extraartikuläre Weichteilreaktionen entstehen durch Interaktionen der Abbauprodukte mit dem umgebenden Weichteilgewebe, in welchem sich darauf Gewebevermehrung und -verhärtung oder lokale Entzündungsreaktionen entwickeln können. Subkutane Serombildung und bakterielle Superinfektion durch die eröffnete Seromhöhle stellen diesbezüglich die schwerwiegendsten Komplikationen dar (41). Hat das Implantat Kontakt zum Gelenkspalt und zur Synovialflüssigkeit, können die Abbauprodukte auch zu intraartikulären, synovialen Weichteilreaktionen führen. Die Schweregrade reichen dabei von milden bis ausgeprägten, sterilen oder keimbesiedelten Gelenkergüssen (41). Eine Übersicht ist in Abbildung 4 dargestellt.

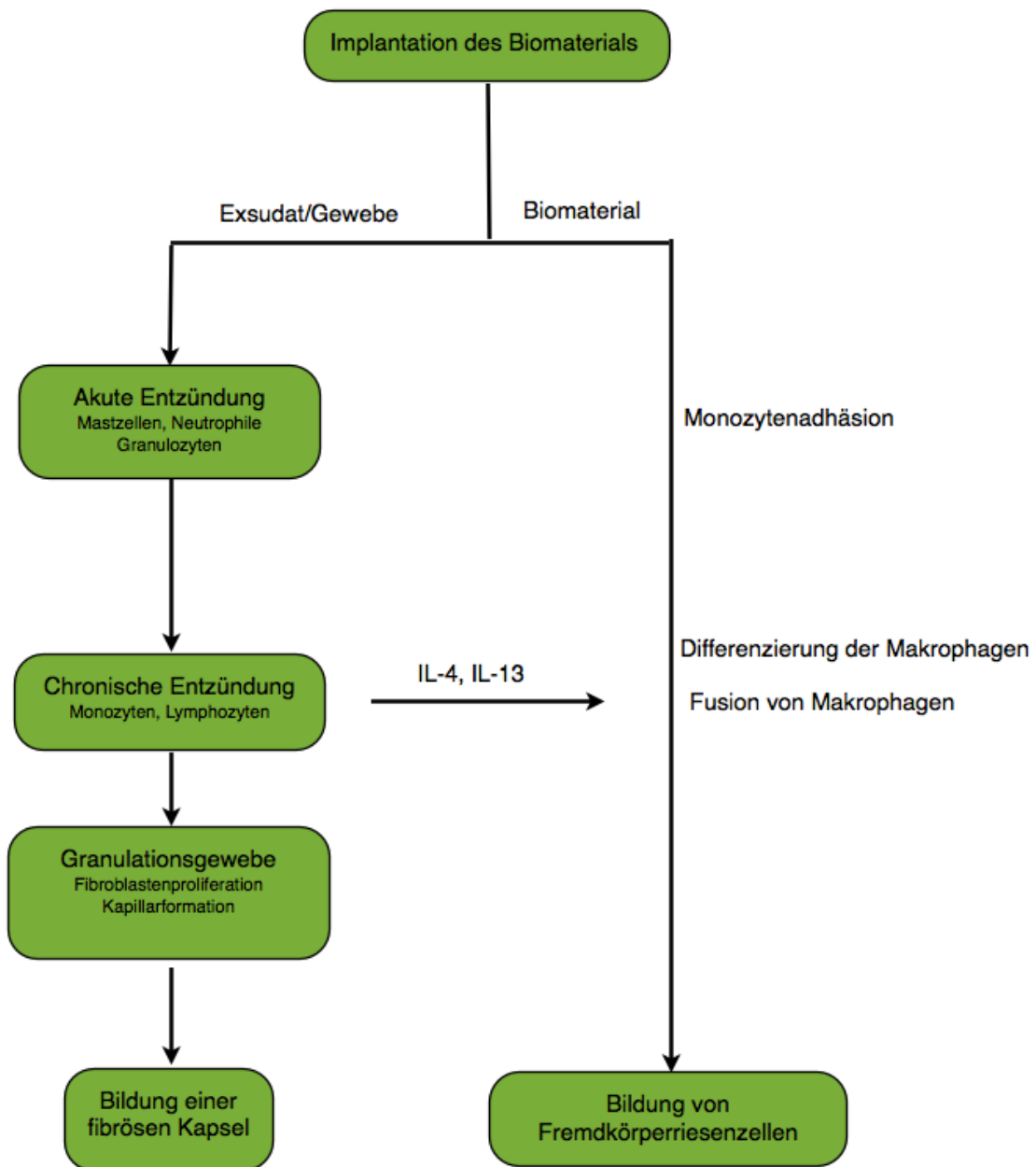


Abbildung 4: Lokale Fremdkörperreaktion, aus (42)

## 5 ZIEL DER STUDIE

Das Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von bioresorbierbaren PHB-Implantaten auf das angeborene Immunsystem zu beurteilen. Es wurde erwartet, dass sich neue Implantatmaterialien durch eine bessere Verträglichkeit auszeichnen und somit zu einer geringeren Entzündungsreaktion führen. Dementsprechend wurde auch eine geringere Osteolyse an der Berührungsstelle zwischen Knochen und Implantat und damit ein besseres Outcome bei biomechanischen Untersuchungen vermutet. Daneben sollte diese Studie auch zu

einem besseren Verständnis über Entzündungsreaktionen bezüglich bioresorbierbarer Implantatmaterialien beitragen. Hierfür wurde ein sehr spezifischer Test im Rattenmodell etabliert und auch die Reaktionen auf den operativen Eingriff untersucht.

## **6 MATERIAL UND METHODEN**

### **6.1 Studiendesign**

Um die Phagozytoseaktivität nach Implantation bioresorbierbarer Materialien zu untersuchen, wurde ein Rattenmodell gewählt. Dazu wurden in einer prospektiven Studie 18 männliche Sprague-Dawley Ratten im Alter von 5 Wochen per Zufall in 3 Gruppen zu je 6 Ratten unterteilt. Nach einwöchiger Akklimatisationsphase im Tierstall des Instituts für Biomedizinische Forschung (IBF) der Medizinischen Universität Graz (MUG), Roseggerweg 48, 8036 Graz, wurden die Tiere der Versuchsgruppe B beidseitig mit einem transkortikalen Bohrloch durch die Mitte jedes Femurschafts und einem bioresorbierbaren Implantat aus PHB + 3% Zirkonium versorgt. In der Kontrollgruppe C erhielten die Tiere beidseitig ein transkortikales Bohrloch an gleicher Stelle wie die Tiere der Gruppe B, es wurden jedoch keine Pins implantiert. Die Ratten in der Sham-Gruppe S mussten sich keiner Behandlung unterziehen. Die ermittelten Ergebnisse dieser Gruppe dienten als Referenzwerte. Um die Phagozytoseaktivität zu analysieren erfolgten Blutabnahmen kurz vor der Operation und dann wöchentlich in den ersten drei postoperativen Wochen. Die Blutproben wurden daraufhin im immunologischen Labor der Klinischen Abteilung für Rheumatologie und Immunologie der MUG, Auenbruggerplatz 10, 8036 Graz aufbereitet und mittels Durchflusszytometrie untersucht.

### **6.2 PHB-Implantate**

Im Rahmen der Studie wurden bioresorbierbare Implantate aus Polyhydroxybutyrat in Kombination mit 3% Zirkonium gewählt. Die 8 mm langen, im Durchmesser 1,6 mm messenden, zylindrischen Pins wurden im Zuge des Laura-Bassi Projektes von der Technischen Universität (TU) Graz für diese Versuchsreihe produziert (siehe Abbildung 5).

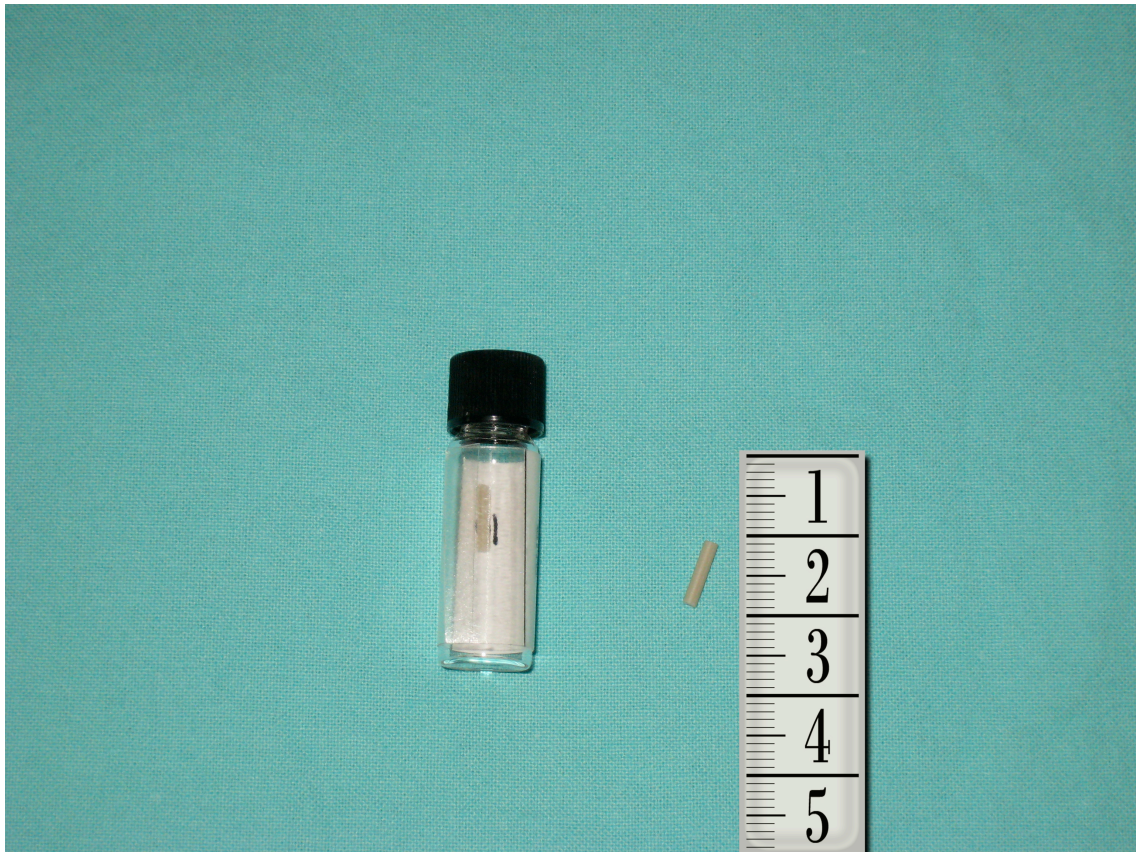


Abbildung 5: PHB-Pin

### 6.3 Tierversuche

Alle Tierversuche fanden in den Räumlichkeiten des IBF der MUG statt und wurden vom österreichischen Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung gemäss BGBl. I Nr. 162/2005 genehmigt (Genehmigungsnummer: BMWF-66.010/0113-II/10b/2009). Als Versuchstiere dienten 18 männliche Sprague-Dawley Laborratten im Alter von 5 Wochen mit einem Gewicht von 120-150 g, welche vom Institut für Labortierkunde und Laborgenetik (Himberg, Österreich) bezogen wurden. Während der Versuche waren die Tiere im IBF der MUG untergebracht. Jeweils vier Ratten teilten sich einen Käfig im Tierstall des IBF und wurden dort uneingeschränkt mit speziellen Futterpellets (ssniff®, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Trinkwasser versorgt. Die Lichtverhältnisse wurden dem optimalen 12-stündigen Tag-Nacht Rhythmus der Ratten angepasst. Nach einwöchiger Akklimatisationsphase wurden die Ratten für das weitere Procedere randomisiert in drei Gruppen zu je sechs Tieren aufgeteilt (siehe Tabelle 1).

<b>Gruppe</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>S</b>
<b>n</b>	6	6	6
<b>Operation</b>	Bohrloch durch Femurschaft	Bohrloch durch Femurschaft	nein
<b>Implantat</b>	Polyhydroxybutyrat + 3% Zirkonium	nein	nein

*Tabelle 1: Gruppeneinteilung der Versuchstiere*

### 6.3.1 Anästhesie

Zur Narkoseeinleitung wurden die Ratten im Kleintier-OP des IBF in einer Einleitungsbox mit 3% Forane® (Abbott Laboratories Ltd., Kent, England) bei einem Sauerstoff-Flow von etwa 3l/min betäubt (siehe Abbildung 6). Zur Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte die subkutane Injektion einer 0,1ml/100g Körpergewicht FDD-Narkoselösung (siehe Tabelle 2).

<b>Medikament</b>	<b>Wirkstoff</b>	<b>Hersteller</b>
1 ml Fentanyl ®	50 µg Fentanyl	Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
1 ml Dormicum ®	1 mg Dormicum	Roche Austria GmbH, Wien, Österreich
0,5 ml Domitor ®	0,5 mg Meditomedin	Pfizer Corp. Austria GmbH, Wien, Österreich

*Tabelle 2: Zusammensetzung FDD-Narkoselösung*



Abbildung 6: Narkoseeinleitung

### 6.3.2 Operative Implantation

In Narkose wurde das Fell im Operationsgebiet über dem rechten Femurschaft der Ratte mit Hilfe eines Rasierers entfernt. Anschließend wurde der Bereich mit Betaisodona®-Lösung (Mundipharma GesmbH, Wien, Österreich) steril gewaschen und abgedeckt. Mit dem Skalpell erfolgte der Hautschnitt über dem Femur. Der Femurschaft wurde durch schichtweises, stumpfes Präparieren mit der Schere dargestellt und mittels Bohrmaschine mit einem 1,5 mm großen, transkortikalen Bohrloch durch die Mitte des Femurs versorgt. Je nach Gruppeneinteilung wurde in das Bohrloch entweder ein Implantat aus PHB + 3% Zirkonium eingesetzt oder es wurde darauf verzichtet. Der schichtweise Wundverschluss erfolgte durch Einzelknopfnähte mit Vicryl-rapid® 5-0. Nach der Wundreinigung wurde der Vorgang am zweiten Bein wiederholt (siehe Abbildung 7).

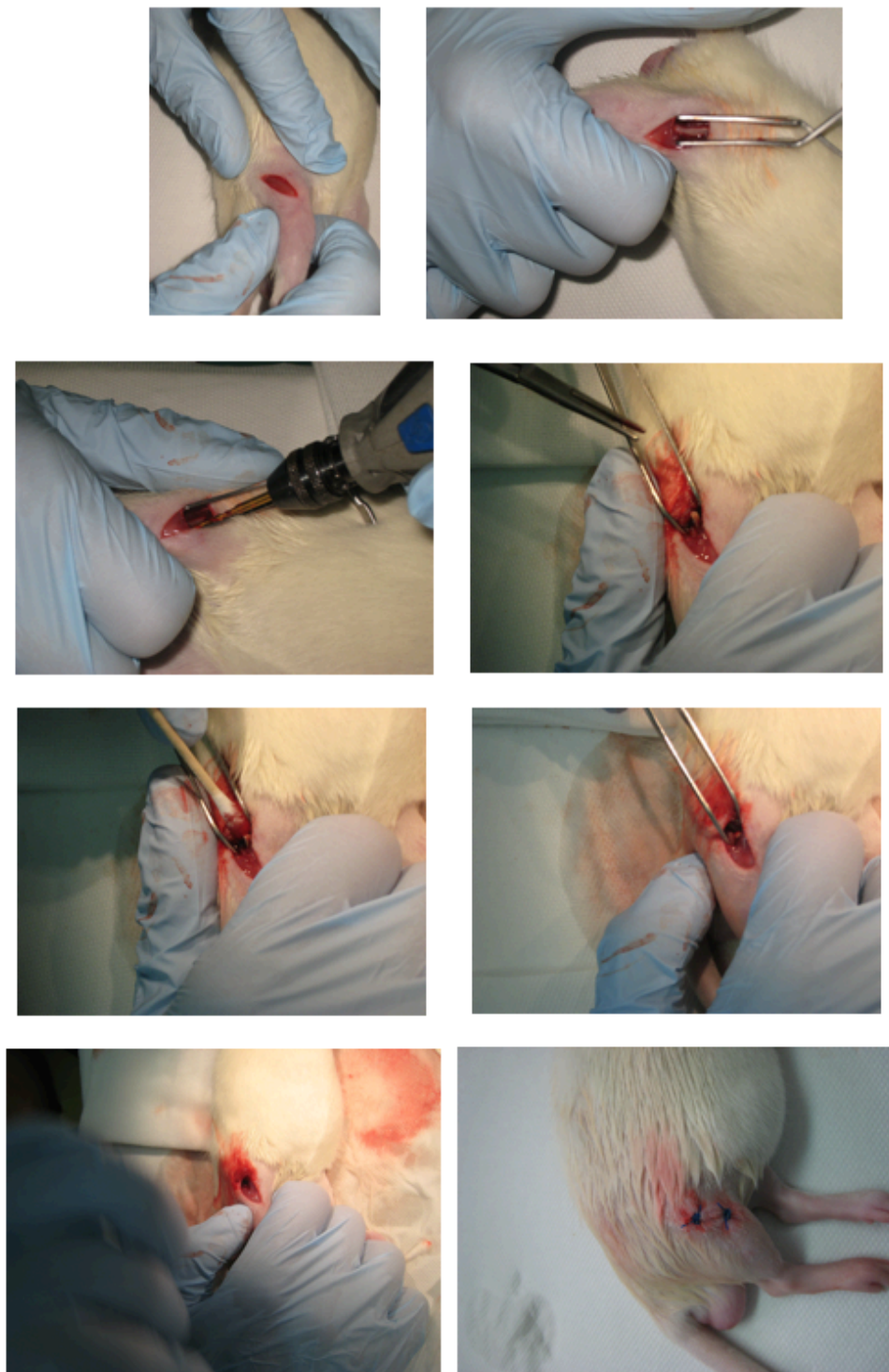


Abbildung 7: Operationsablauf

### 6.3.3 Postoperatives Management

Unmittelbar nach der Operation wurde die Narkose durch intraperitoneale Injektion einer 0,1ml/100g Körpergewicht Antidot-Lösung antagonisiert (siehe Tabelle 3). Um eine Auskühlung zu verhindern, wurden die Tiere bis zum Aufwachen auf einer Wärmematte gelagert. Zur postoperativen Schmerztherapie erhielt jede Ratte unmittelbar nach dem Eingriff eine subkutane Injektion von 0,4 ml verdünntem Rimadyl® (siehe Tabelle 4). Die Injektion wurde einmal täglich für eine Woche fortgesetzt, um die Analgesie sicherzustellen. Für mindestens sieben weitere Tage wurde das Trinkwasser der Ratten mit Dipidolor® und Glucose versetzt (siehe Tabelle 5).

Medikament	Wirkstoff	Hersteller
5 ml Anexate®	0,5 mg Flumazenil	Roche Austria GmbH, Wien, Österreich
0,5 ml Antisedan®	2,5 mg Atipamezol	Pfizer Corp. Austria GmbH, Wien, Österreich
1,5 ml NaCl	NaCl 0,9%	Fresenius Kabi Austria GmbH, Graz, Österreich

*Tabelle 3: Zusammensetzung Antidot-Lösung*

Medikament	Wirkstoff	Hersteller
1 ml Rimadyl®	50 mg Caprofen	Pfizer Corp. Austria GmbH, Wien, Österreich
50 ml NaCl		

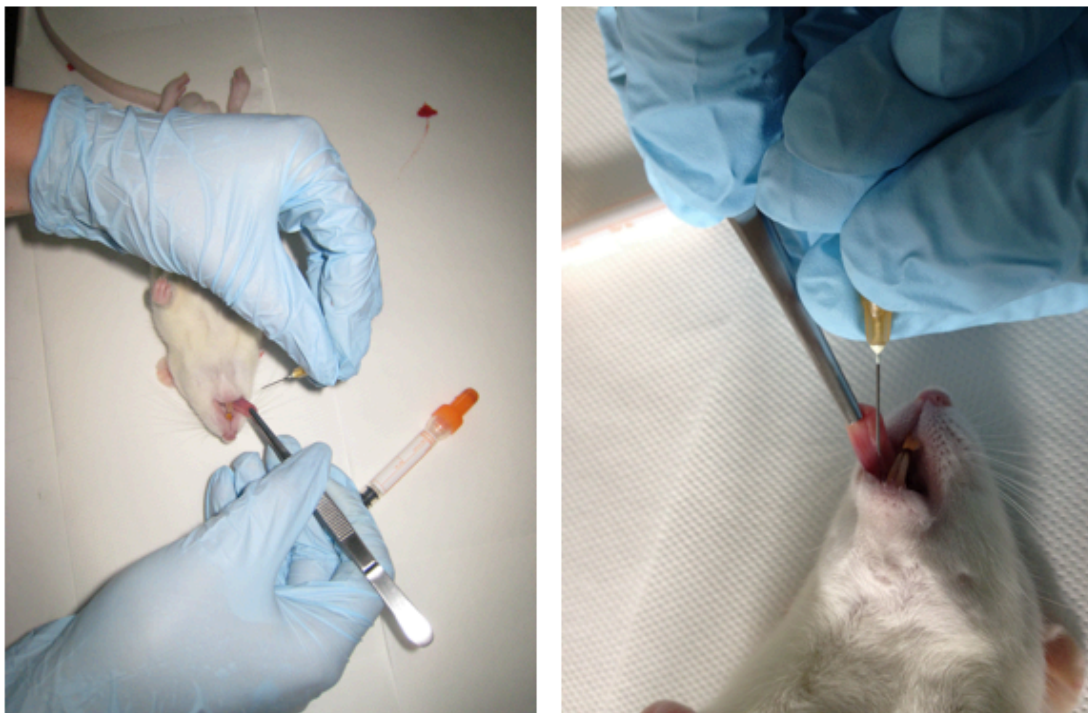
*Tabelle 4: postoperative Schmerzmedikation s.c*

Medikament	Wirkstoff	Hersteller
4 ml Dipidolor® (2 Ampullen)	15 mg Piritramid	Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
20 ml Glucose	Glucose 5%	Fresenius Kabi Austria GmbH, Graz, Österreich
250 ml Wasser		

*Tabelle 5: postoperative Schmerzmedikation Trinkwasser*

### 6.3.4 Blutabnahmen

Die ersten Blutabnahmen erfolgten bei allen Tieren unmittelbar vor der Operation. Danach fanden in den ersten drei postoperativen Wochen wöchentliche Blutabnahmen statt. Vor der Blutabnahme wurden die Ratten in einer Narkosebox mit 3% Forane® (Abbott Laboratories Ltd.) bei einem Sauerstoff-Flow von etwa 3l/min betäubt. Unter laufender Maskennarkose wurde die Zungenvene der Ratte mit einer Kanüle punktiert und 1,2 ml Blut in Lithium-Heparinbeschichtete Röhrchen abgenommen. Um die Blutgerinnung zu verhindern, wurden die Blutproben zusätzlich mit 50 µl Heparin (5000I.E./ml) versetzt (siehe Abbildung 8).



*Abbildung 8: Blutabnahme*

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
S-Monovette ® Lithium-Heparin, 1,2 ml	Sarstedt AG&Co, Wiener Neustadt, Österreich
Sterican ® Kanülen, 20G	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
BD-Microfin + ® Insulinspritze, 0,5ml	Becton, Dickinson&Co., Schwechat, Österreich
Heparin Immuno ® 5000 I.E./ml, Durchstichflasche, 5ml	Baxter, VertriebsGmbH, Wien
Einmalpinzetten	

*Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien Blutabnahmen*

## **6.4 Laboruntersuchungen**

Die Untersuchungen und Auswertungen der Blutproben erfolgten im immunologischen Labor der Klinischen Abteilung für Rheumatologie und Immunologie der MUG. Die benötigten Reagenzien wurden, wie in der Gebrauchsanweisung beschrieben, als komplette Testkits von der Firma Orpegen Pharma GmbH (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Alle zusätzlichen Materialien wie Pipetten, Probenröhrchen, Zentrifugen und Inkubatoren wurden vom immunologischen Labor der MUG zur Verfügung gestellt.

### **6.4.1 Phagotest ®**

Mit dem Phagotest® (Orpegen Pharma) ist es möglich, die Phagozytoseaktivität von Monozyten und Granulozyten aus heparinisiertem Vollblut zu quantifizieren. Im Folgenden wird der Versuchsablauf nach Anleitung beschrieben: 100 µl heparinisiertes Vollblut werden bei 0 °C mit 20 µl Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierten, opsonisierten E.coli Bakterien vermischt und bei 37 °C inkubiert, um die Phagozytose zu ermöglichen. Eine Negativkontrolle wird bei 0 °C auf Eis gelagert. Anschließend werden 100 µl der eisgekühlten Quenching-Lösung zugegeben, um die Phagozytose zu beenden und eine Fluoreszenzauslöschung

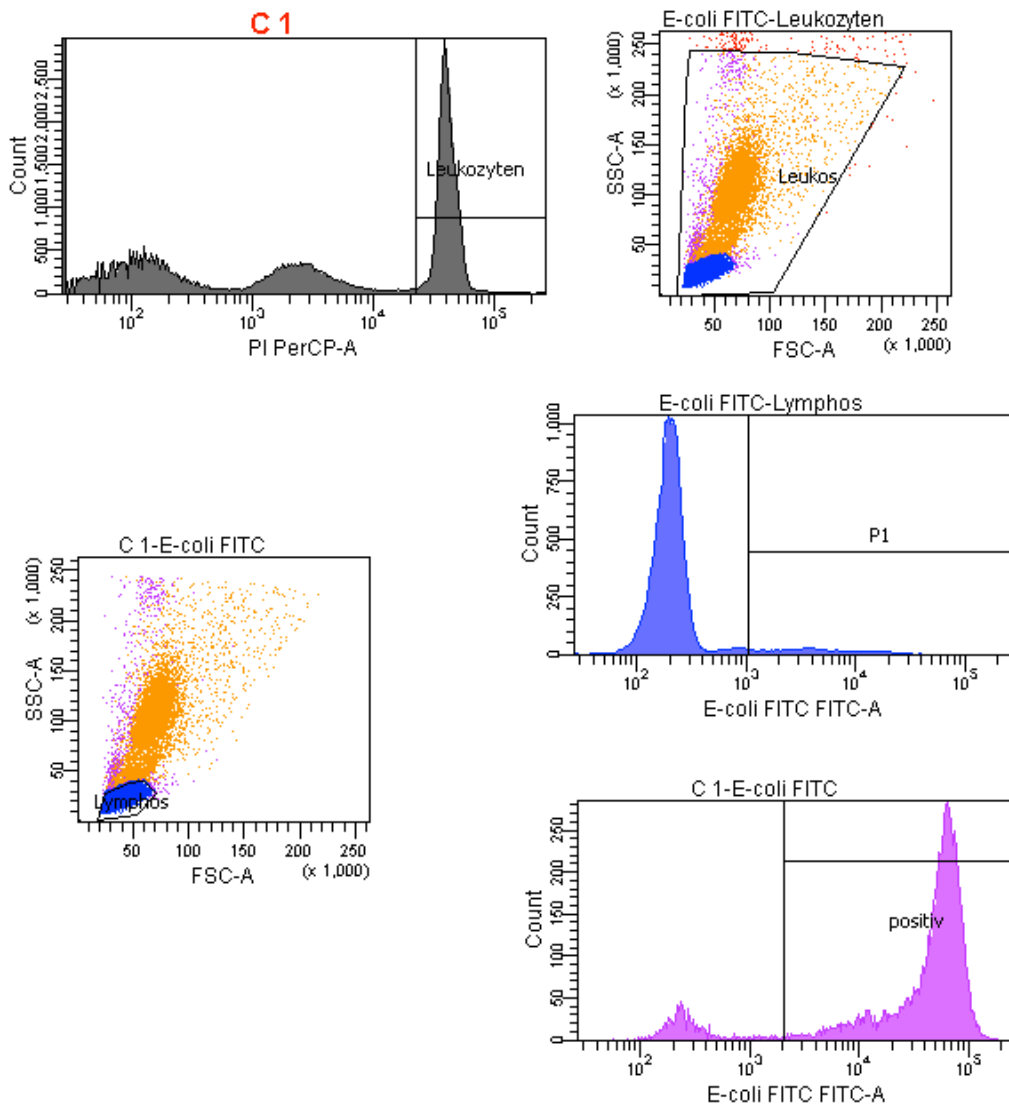
auszulösen. In zwei Waschgängen wird die Probe mit je 3 ml Waschlösung versetzt, anschließend zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Durch Zugabe von 2 ml Lyse-Lösung werden die Erythrozyten entfernt. Bei Raumtemperatur erfolgt eine zwanzigminütige Inkubation, danach werden die Proben erneut zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Ein neuerlicher Waschgang mit 3 ml Waschlösung wird angeschlossen und durch Zentrifugieren beendet. Um die DNA zu färben und Artefakte auszuschließen, werden 200 µl Färbe-Lösung zugegeben und die Probe zehn Minuten auf Eis inkubiert. Mittels Durchflusszytometrie werden die Proben untersucht. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt durch Dot-Plots um Größe und Granularität darzustellen (Zellen die generell phagozytieren) und Histogramme zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität (Phagozytoseaktivität der einzelnen Zellen) (43).

#### **6.4.2 Geräte und Software**

Um die fluoreszenzmarkierten Phagozyten auf ihre Größe, Granularität und Aktivität zu untersuchen, erfolgte die durchflusszytometrische Analyse mittels eines FACSCanto II ® Durchflusszytometers (BD Biosciences, New Jersey, USA). Zur Auswertung der Ergebnisse wurde die Software FACSDiva 6.1.3 ® (BD Biosciences) verwendet. Dabei wurden die Untersuchungsergebnisse als Histogramm bzw. Dot-Plot dargestellt.

#### **6.5 Graphisch quantitative Auswertung**

Mit der Software FACSDiva 6.1.3 ® (BD Biosciences) wurden die Versuchsergebnisse graphisch dargestellt (Siehe Abbildung 9). Durch die charakteristische Lichtstreuung im Durchflusszytometer können die Zellen anhand ihrer Größe (FSC, forward-scatter, Vorwärts-Streulicht) und ihrer Granularität (SSC, side-scatter, Seitwärts-Streulicht) differenziert werden.



Tube: E-coli FITC

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	70,713	###	100.0
Leukozyten	30,000	42.4	42.4
Leukos	28,808	96.0	40.7
Lymphos	21,135	73.4	29.9
P1	1,428	6.8	2.0
Granulo plus Mono	7,673	26.6	10.9
positiv	6,865	89.5	9.7

Experiment Name: Phago KK 20062011 VK  
 Specimen Name: C 1  
 Tube Name: E-coli FITC  
 Record Date: Jun 20, 2011 9:53:49 AM

Population	E-coli FITC FITC-A Geo Mean	E-coli FITC FITC-A Mean
P1	4,500	6,737
positiv	44,470	54,584

Abbildung 9: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse

## **6.6 Statistische Auswertung**

Mit dem Programm Microsoft Excel® (Microsoft Office 2010, Microsoft Corporation, Redmond, USA) wurden Rohdaten und Testergebnisse erfasst und daraus anschließend Balken- und Kurvendiagramme erstellt. Die statistische Auswertung und Darstellung als Scatter-Plots erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 5.0 ® für Mac OS X (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Um Unterschiede zwischen zwei Gruppen zu evaluieren wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney U-Test verwendet. Zur Untersuchung von Unterschieden in der Signifikanz von drei oder mehreren Gruppen wurde eine Varianzanalyse (One-Way ANOVA, Kruskal-Wallis Test) durchgeführt. Testergebnisse wurden als signifikant bewertet, wenn  $p < 0,05$  war.

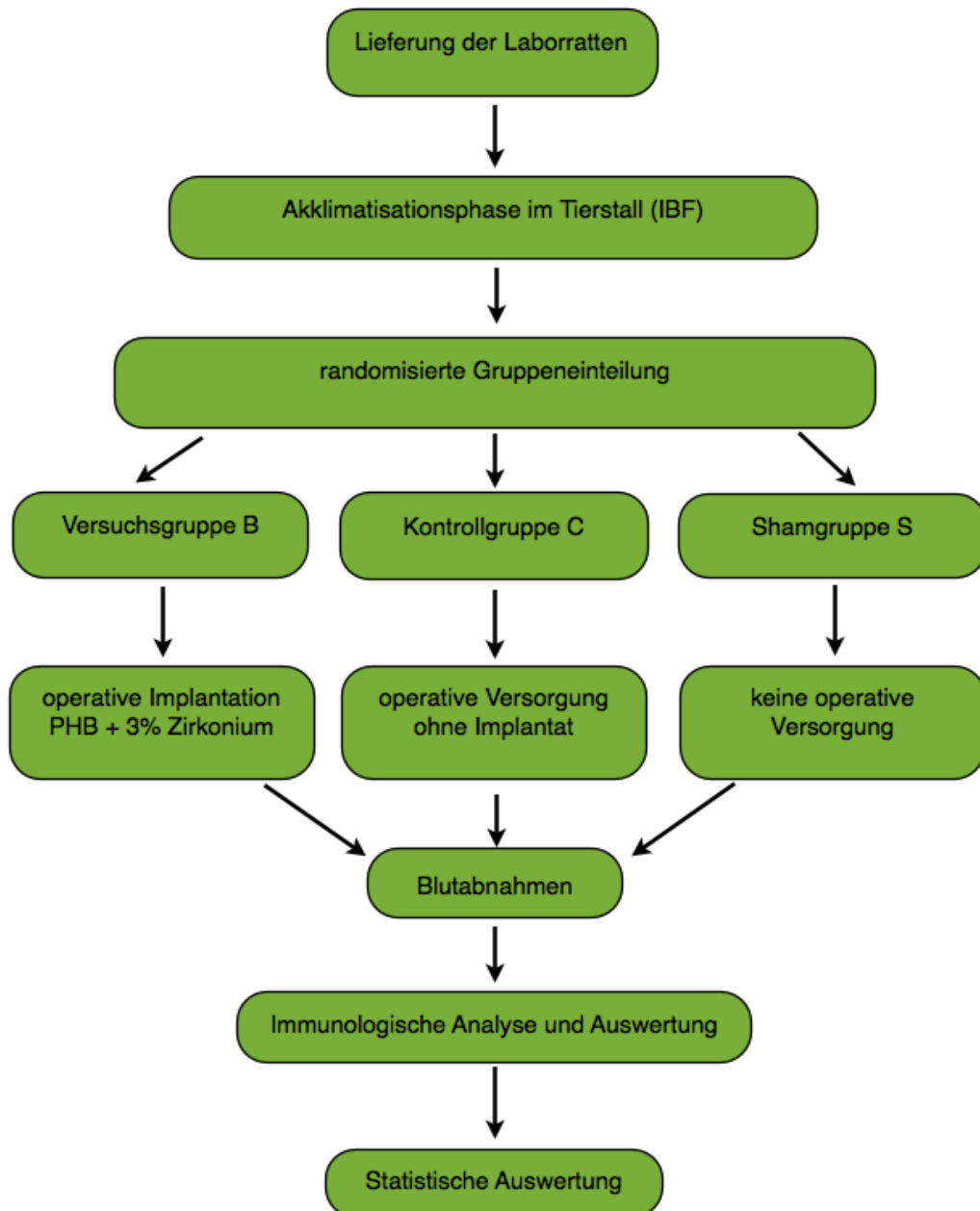


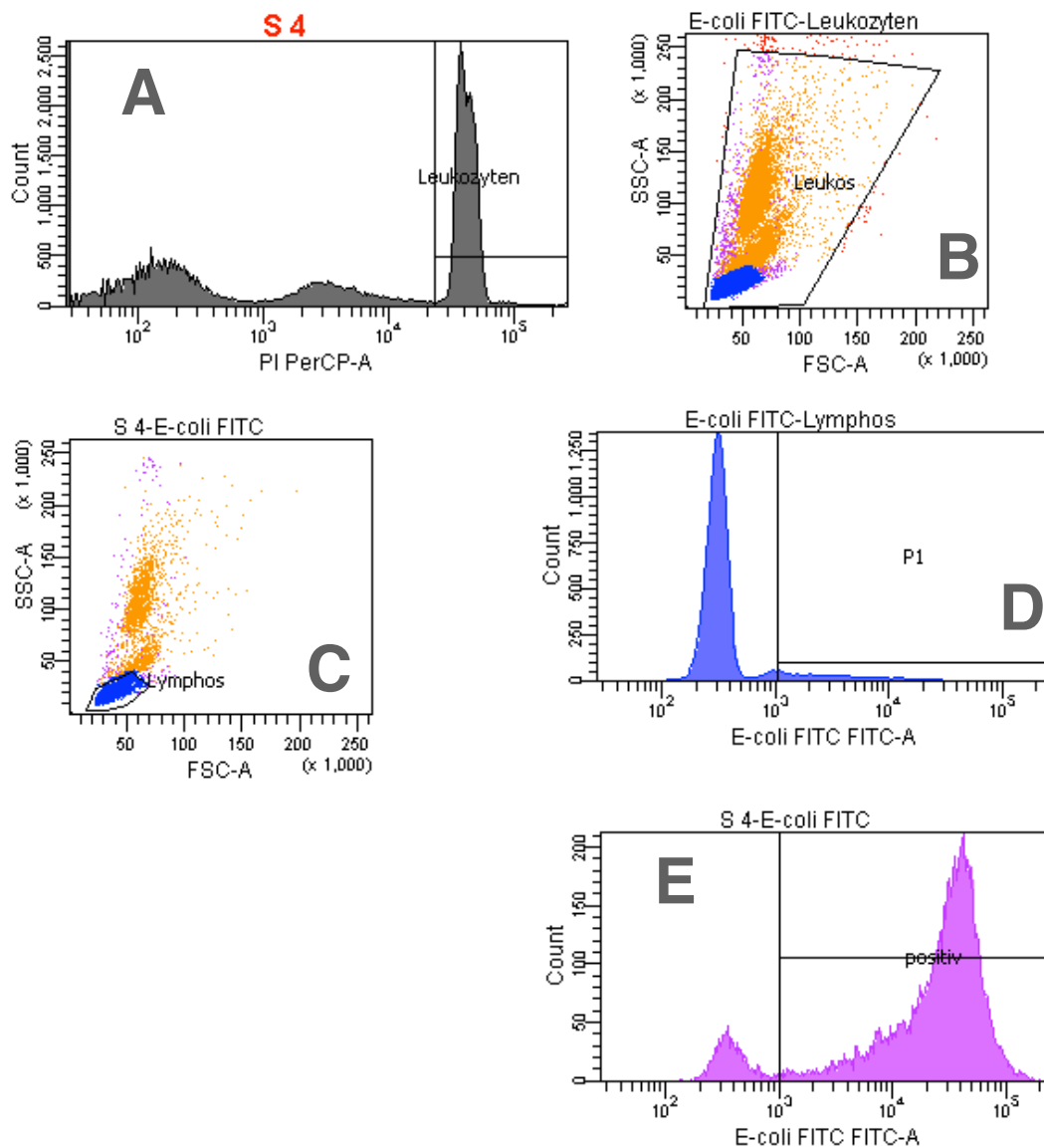
Abbildung 10: Übersicht über den Studienablauf

## 7 ERGEBNISSE

Die Operationen verliefen bei allen Tieren komplikationslos. Es kam zu keinen Ausfällen oder Todesfällen. Alle Tiere konnten über den geplanten Zeitraum nachuntersucht werden.

### 7.1 Graphische Auswertung

Jede Blutprobe wurde wie unter 6.5 beschrieben graphisch ausgewertet. Innerhalb der Leukozyten (rot) ließen sich die Lymphozyten (blau) sehr gut von den übrigen Zellen unterscheiden. Sie sind die kleinsten Zellen und beinhalten nur wenige Granula. Bei Monozyten und Granulozyten hingegen fiel die Unterscheidung sehr schwer, da diese ähnlich groß sind und sich nur durch ihre Granularität unterscheiden. Diese beiden Zelltypen wurden deshalb zusammengefasst und als einheitliche Population betrachtet (pink). Die phagozytose-positiven Granulozyten und Monozyten wurden orange dargestellt. Mit Hilfe von verschiedenen Gates ließen sich die einzelnen Zellpopulationen genauer auf ihre Fluoreszenz untersuchen (B). In Histogrammen wurde die Fluoreszenzintensität der Anzahl der phagozytierenden Zellen gegenübergestellt. Um zu Beginn Bakterienaggregate aus der Analyse auszuschließen, wurde mittels rotfluoreszierendem DNA-Farbstoff der DNA-Gehalt der Zellen detektiert. Die Leukozyten konnten nun im grauen Histogramm abgegrenzt werden (A). Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität der phagozytierenden Zellen mittels grünfluoreszierendem FITC-Farbstoff untersucht. Da Lymphozyten üblicherweise nicht durch die FITC-markierten E.coli Bakterien stimuliert werden, konnten diese ebenfalls aus der Analyse ausgeschlossen werden (C). Der Gipfel ganz links im blauen Histogramm zeigt die phagozytose-negativen Lymphozyten zur Kontrolle (D). Im pinken Histogramm werden die Granulozyten und Monozyten dargestellt. Die Fluoreszenz der phagozytose-positiven Zellen zeigt sich als charakteristischer Gipfel auf der rechten Seite des Histogramms (E) (Siehe Abbildungen 11-13).

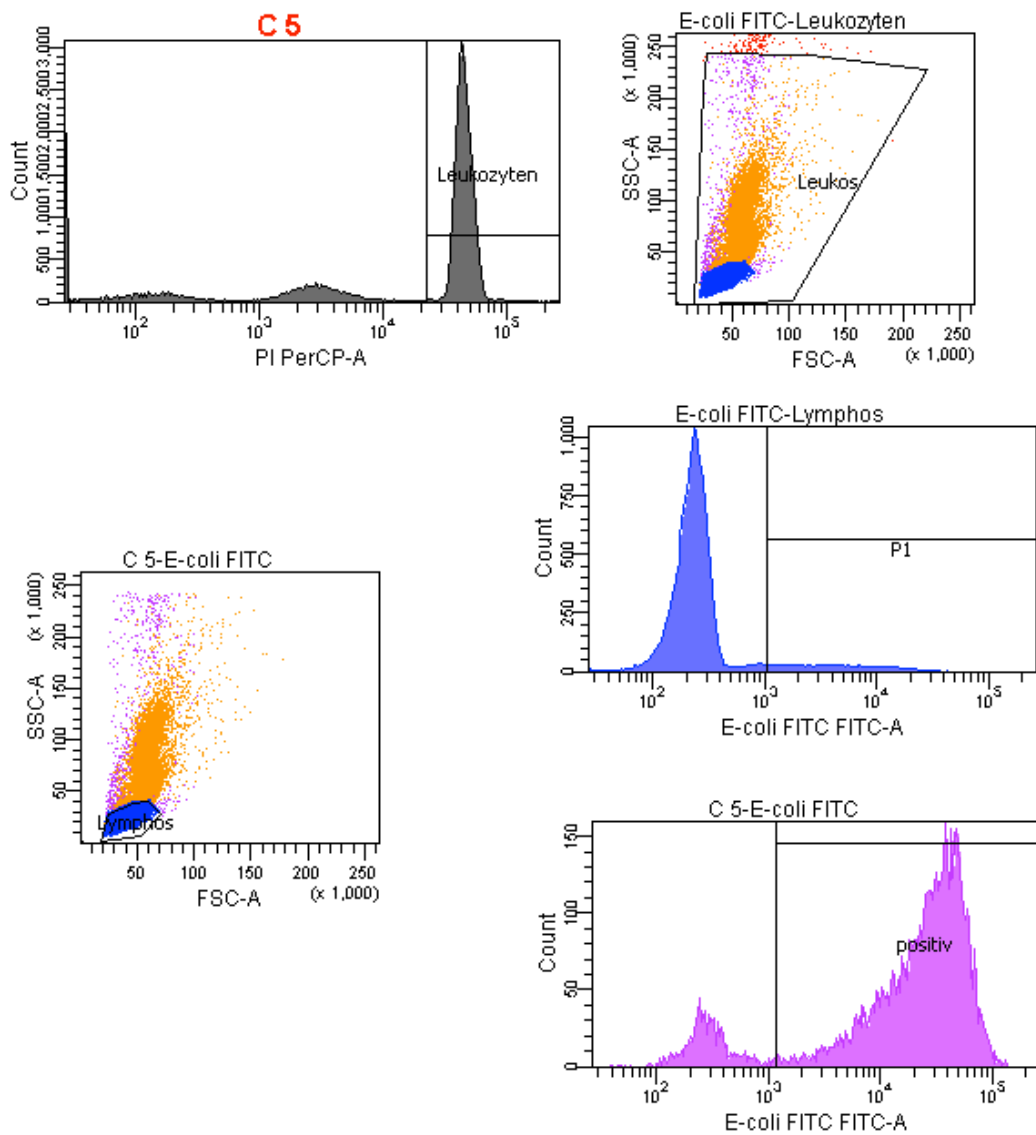


Tube: E-coli FITC			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	66,151	###	100.0
Leukozyten	29,851	45.1	45.1
Leukos	28,678	96.1	43.4
Lymphos	20,475	71.4	31.0
P1	1,813	8.9	2.7
Granulo plus Mono	8,203	28.6	12.4
positiv	7,436	90.6	11.2

Experiment Name: Phago Kinderklinik 24052011 VK			
Specimen Name: S 4			
Tube Name: E-coli FITC			
Record Date: May 24, 2011 10:54:16 AM			
Population	E-coli FITC FITC-A	E-coli FITC FITC-A	
	Geo Mean	Mean	
P1	3,174	4,692	
positiv	26,044	34,584	

Abbildung 11: Auswertungsbeispiel Gruppe S



Tube: E-coli FITC

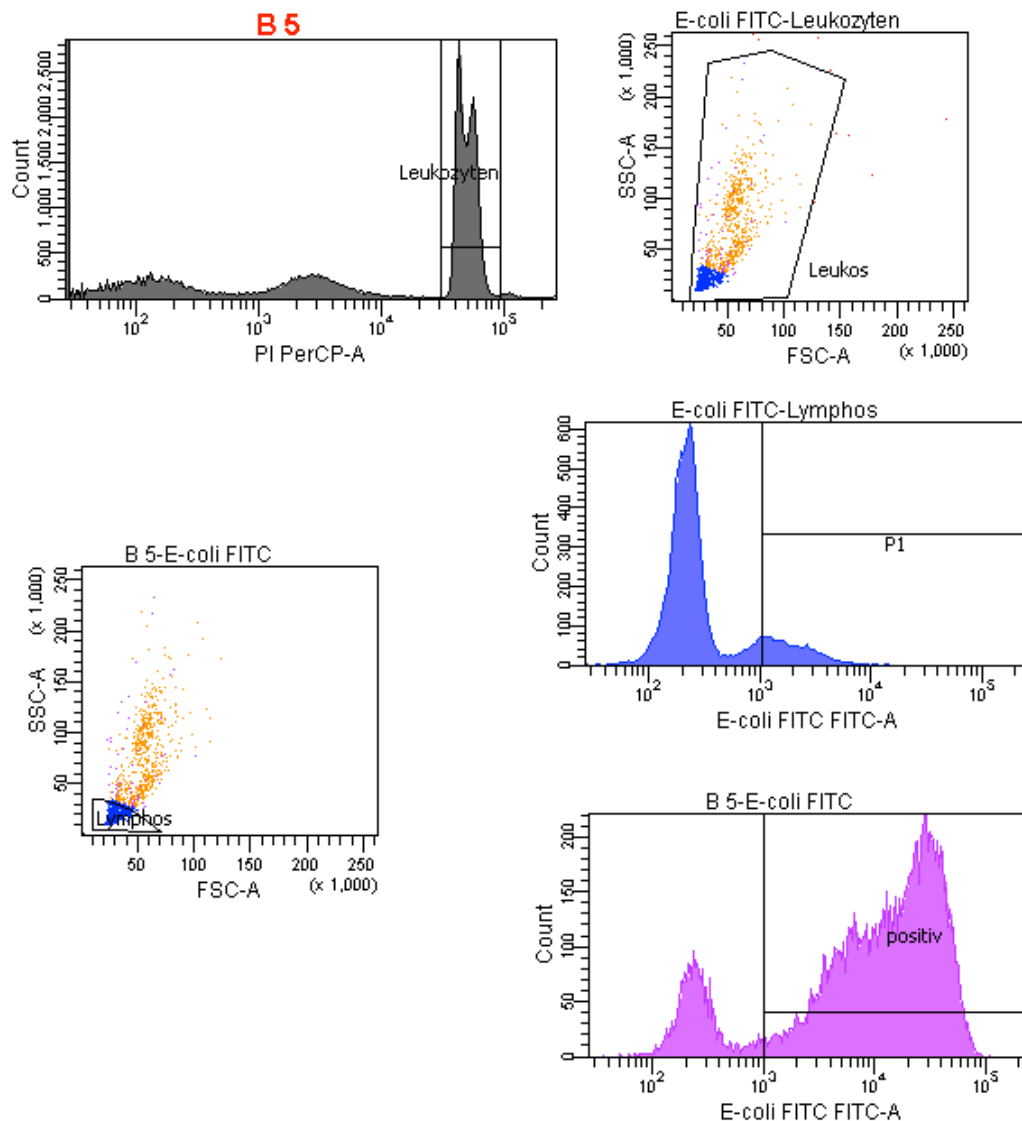
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	43,556	###	100.0
Leukozyten	30,000	68.9	68.9
Leukos	29,238	97.5	67.1
Lymphos	22,113	75.6	50.8
P1	2,005	9.1	4.6
Granulo plus Mono	7,125	24.4	16.4
positiv	6,286	88.2	14.4

Experiment Name: Phago KK 20062011 VK  
 Specimen Name: C 5  
 Tube Name: E-coli FITC  
 Record Date: Jun 20, 2011 10:14:02 AM

Population	E-coli FITC FITC-A Geo Mean	E-coli FITC FITC-A Mean
P1	4,311	6,434
positiv	24,604	32,515

Abbildung 12: Auswertungsbeispiel Gruppe C



Tube: E-coli FITC

Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	58,911	###	100.0
■ Leukozyten	29,194	49.6	49.6
■ Leukos	28,376	97.2	48.2
■ Lymphos	14,571	51.3	24.7
⊠ P1	2,126	14.6	3.6
■ Granulo plus Mono	13,805	48.7	23.4
■ positiv	11,772	85.3	20.0

Experiment Name: Phago Kinderklinik 14042011 Ho  
 Specimen Name: B 5  
 Tube Name: E-coli FITC  
 Record Date: Apr 13, 2011 10:12:18 AM

Population	E-coli FITC FITC-A Geo Mean	E-coli FITC FITC-A Mean
⊠ P1	2,044	2,363
■ positiv	14,256	20,852

Abbildung 13: Auswertungsbeispiel Gruppe B

## 7.2 Statistische Auswertung

### Ausgangswerte:

Die Auswertung der Phagozytoseaktivität vor der Operation zeigte in allen drei Gruppen homogene Ausgangswerte. In Gruppe S betragen sie im Mittel 61,1% (Spannweite: 37% - 73%, Standardabweichung: 12,6), in Gruppe C 51,15% (Spannweite: 47,8% - 54,3%, Standardabweichung: 2,7) und in Gruppe B 63% (Spannweite: 47% - 92,1%, Standardabweichung: 17,9) (siehe Tabelle 7, Abbildung 14). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (S vs. B:  $p=0,07$ , S vs. C:  $p=0,06$ , B vs. C:  $p=0,13$ ). Auch die One-way ANOVA ergab keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,099$ ).

	S 0	C 0	B 0
Minimum	37	47,8	47
25% Percentile	53,95	48,1	50,9
Median	64,55	51,55	59,7
75% Percentile	69,02	53,7	76,64
Maximum	73	54,3	92,07
Mittelwert	61,07	51,15	62,95
Standardabweichung	12,63	2,738	17,19
Standardfehler	5,156	1,118	7,689

Tabelle 7: Deskriptive Statistik präoperativ

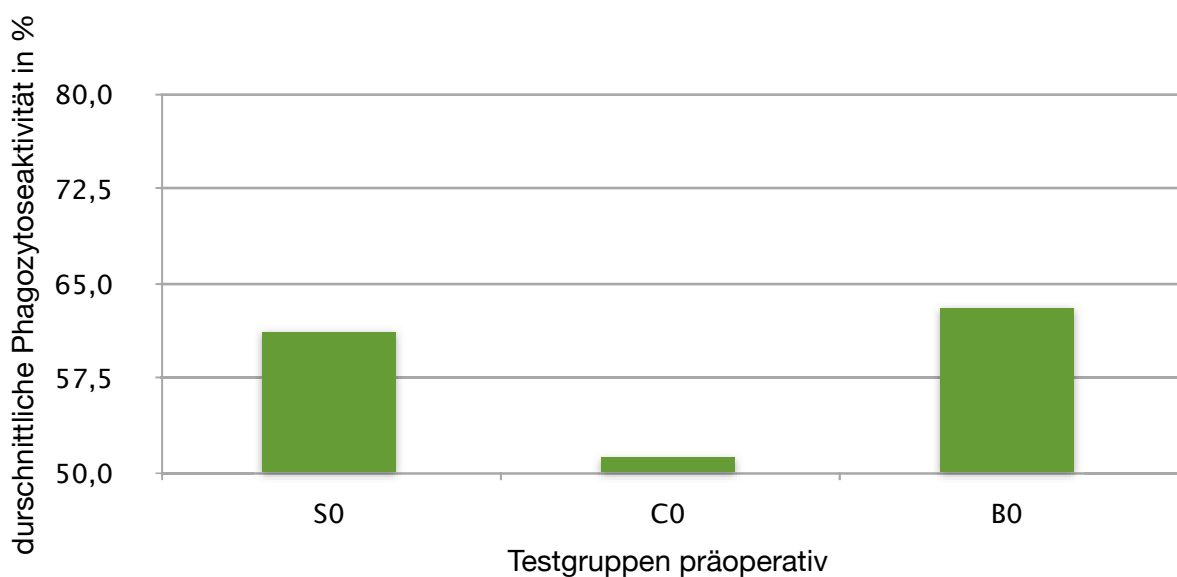


Abbildung 14: Mittelwerte zu Beginn der Studie

Ausgehend von diesen homogenen präoperativen Werten haben wir an verschiedenen postoperativen Zeitpunkten die Werte der einzelnen Gruppen miteinander verglichen und dabei folgende Ergebnisse erzielt (siehe Abbildung 18):

### 1 Woche postoperativ:

Eine Woche postoperativ zeigten sich entsprechend der One-way ANOVA signifikante Unterschiede zwischen den Studiengruppen ( $p=0,0062$ ). Gegenüber der Gruppe S zeigte sich ein Abfall der Phagozytoseaktivität in den Gruppen C und B. Die niedrigsten Werte wurden in der Gruppe mit dem implantierten bioresorbierbaren Pin gefunden. In Gruppe S betragen sie im Mittel 68,6% (Spannweite: 63,1% - 71,3%, Standardabweichung: 10,77), in Gruppe C 56% (Spannweite: 40,2% - 54,3%, Standardabweichung: 2,7) und in Gruppe B 41,13% (Spannweite: 26,8% - 62,8%, Standardabweichung: 18,56) (siehe Tabelle 8, Abbildung 15). Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen B und C im Vergleich zur Gruppe S (S vs. B:  $p = 0,002$ , S vs. C:  $p = 0,026$ ). Zwischen Gruppe B und Gruppe C zeigten sich eine Woche postoperativ keine statistisch signifikanten Unterschiede ( $p=0,13$ ).

	S 1	C 1	B 1
Minimum	63,1	40,2	15
25 % Percentile	65,13	46,2	26,78
Median	68,35	57,3	39,3
75 % Percentile	72,68	64,03	60,48
Maximum	73,2	71,3	62,8
Mittelwert	68,55	55,98	41,13
Standardabweichung	3,863	10,77	18,56
Standardfehler	1,577	4,396	7,577

*Tabelle 8: Deskriptive Statistik 1 Woche postoperativ*

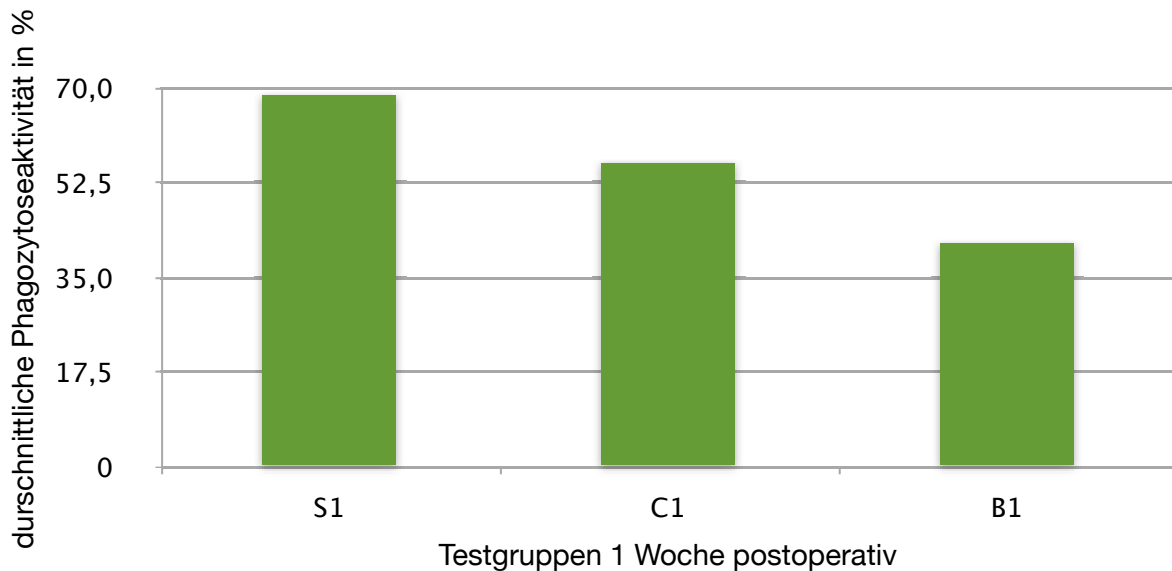


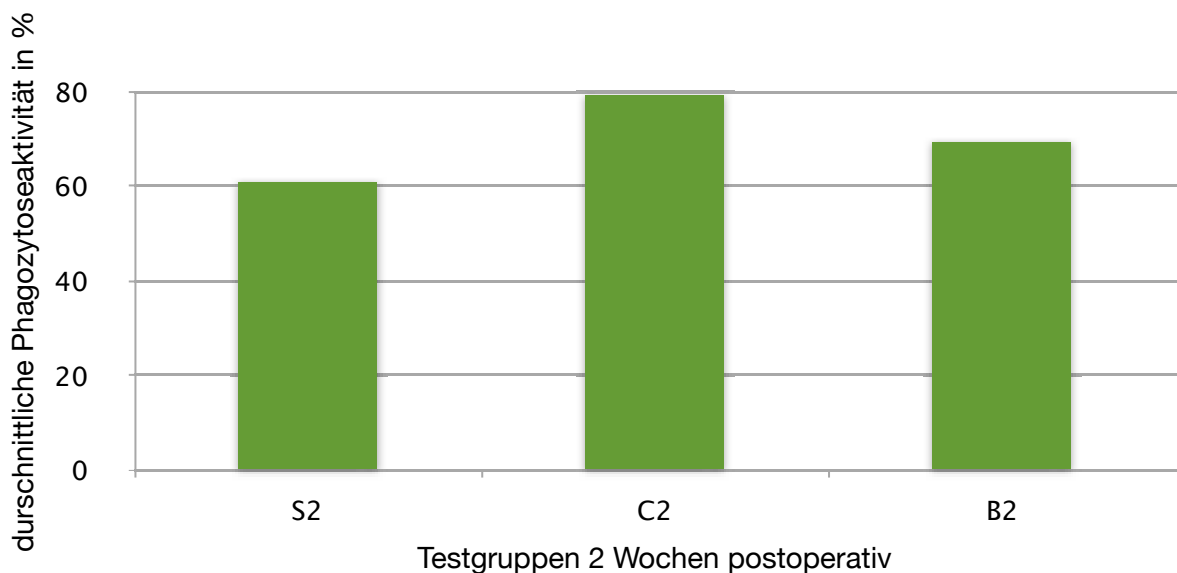
Abbildung 15: Mittelwerte 1 Woche postoperativ

## 2 Wochen postoperativ:

Auch zwei Wochen nach dem Eingriff zeigten sich entsprechend der One-way ANOVA signifikante Unterschiede zwischen den Studiengruppen ( $p = 0,0383$ ), wobei es zu einem Anstieg der Phagozytoseaktivität in den Gruppen C und B gegenüber der Gruppe S kam. Die höchsten Werte wurden in Gruppe C beobachtet, in der Gruppe mit den bioresorbierbaren Implantaten war der Unterschied zur Sham-Gruppe weniger stark ausgeprägt. In der Gruppe S betrug die Phagozytoseaktivität im Mittel 60,8% (Spannweite: 36,6% - 75,4%, Standardabweichung: 15,1), in Gruppe C 79,1% (Spannweite: 75,7% - 81,5%, Standardabweichung: 2,2) und in Gruppe B 69,3% (Spannweite: 41,3% - 83,1%, Standardabweichung: 16,7) (siehe Tabelle 9, Abbildung 16) Es zeigten sich signifikante Unterschiede im Vergleich von Gruppe S und Gruppe C (S vs. C:  $p=0,004$ ). Zwischen Gruppe S und B, sowie zwischen Gruppe B und Gruppe C zeigten sich zwei Wochen postoperativ keine statistisch signifikanten Unterschiede (S vs. B:  $p=0,31$ , B vs. C:  $p=0,46$ ).

	S 2	C 2	B 2
Minimum	36,6	75,7	41,3
25 % Perzentile	46,75	76,9	54,9
Median	66	79,7	72,9
75 % Perzentile	72,25	80,75	81,8
Maximum	75,4	81,5	83,1
Mittelwert	60,8	79,07	69,26
Standardabweichung	15,08	2,189	16,68
Standardfehler	6,745	0,8936	7,461

*Tabelle 9: Deskriptive Statistik 2 Wochen postoperativ*



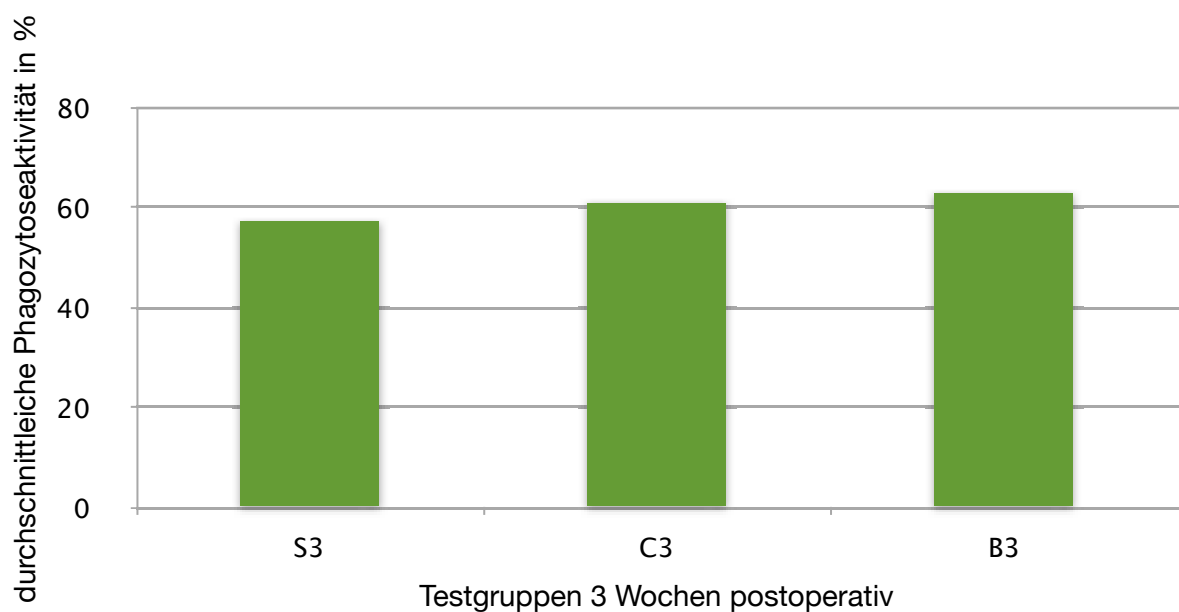
*Abbildung 16: Mittelwerte 2 Wochen postoperativ*

### **3 Wochen postoperativ:**

Drei Wochen nach Intervention fanden sich in allen drei Gruppen wieder homogene Werte (One-way ANOVA:  $p=0,2$ ). In der Gruppe S betragen sie im Mittel 57,5% (Spannweite: 53% - 62,2%, Standardabweichung: 3,9), in Gruppe C 60,8% (Spannweite: 53% - 66%, Standardabweichung: 5,4) und in Gruppe B 62,7% (Spannweite: 59,6% - 69,4%, Standardabweichung: 4,3) (siehe Tabelle 10, Abbildung 17). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (S vs. B:  $p=0,13$ , S vs. C:  $p=0,26$ , B vs. C:  $p=0,42$ ).

	S3	C3	B3
Minimum	53	53	59,6
25% Percentile	53,68	55,48	59,75
Median	56,2	61,65	60,2
75% Percentile	61,15	65,93	67,45
Maximum	62,2	66	69,4
Mittelwert	57,05	60,75	62,67
Standardabweichung	3,851	5,366	4,299
Standardfehler	1,572	2,191	1,755

*Tabelle 10: Deskriptive Statistik 3 Wochen postoperativ bei Studienabschluss*



*Abbildung 17: Durchschnittswerte 3 Wochen postoperativ*

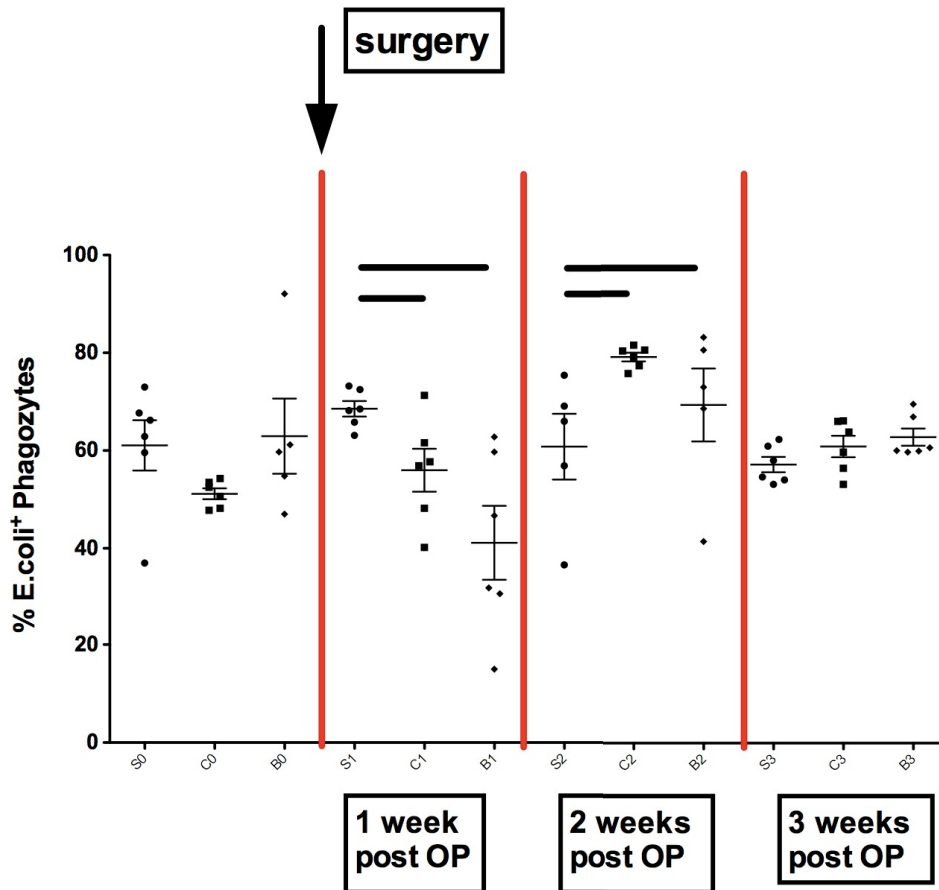


Abbildung 18: Vergleich der einzelnen Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, die Balken stehen für statistisch signifikante Unterschiede entsprechend der One-way ANOVA 1 und 2 Wochen postoperativ

Anschließend haben wir die Werte an den festgelegten Zeitpunkten innerhalb der einzelnen Gruppen miteinander verglichen (Abbildung 22).

### Gruppe S:

In der Gruppe S zeigten sich über den gesamten Studienverlauf sehr ähnliche Werte (Abbildung 19). Die One-way ANOVA ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede ( $p=0,06$ ).

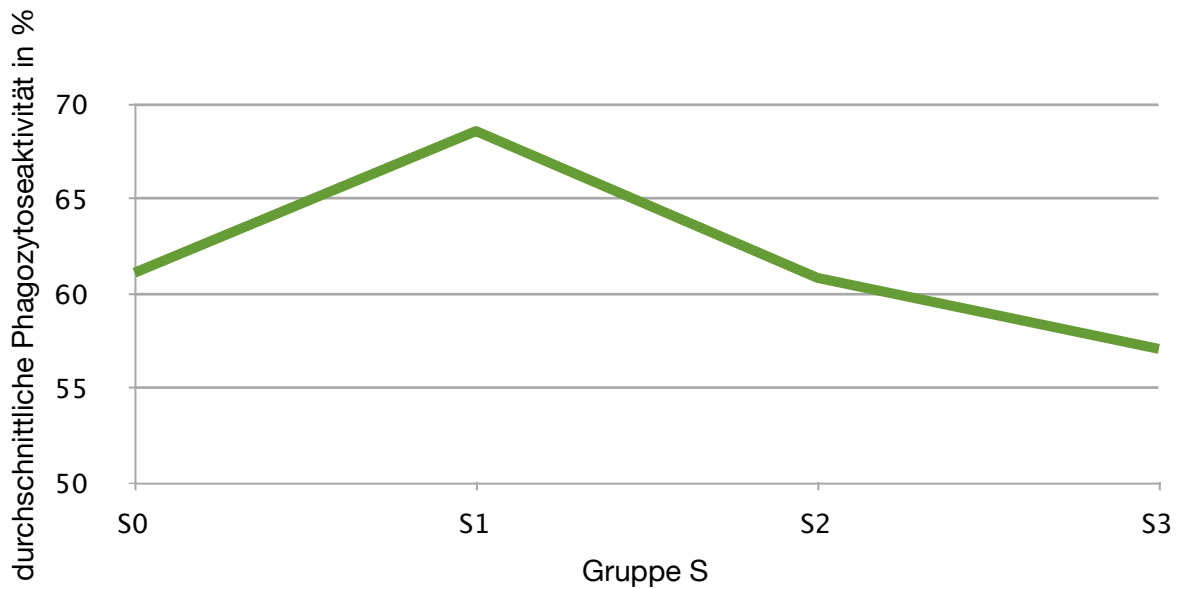


Abbildung 19: Mittelwerte der Phagozytoseaktivität: Gruppe S im Verlauf

### Gruppe C:

In Gruppe C zeigte sich über den Verlauf eine Zunahme der Phagozytoseaktivität mit einem Maximum 2 Wochen postoperativ (79,1%) (Abbildung 20). Gegenüber dem Ausgangswert (51,2%) und den Werten 1 Woche postoperativ (56%) waren diese Werte signifikant höher ( $p=0,002$ ).

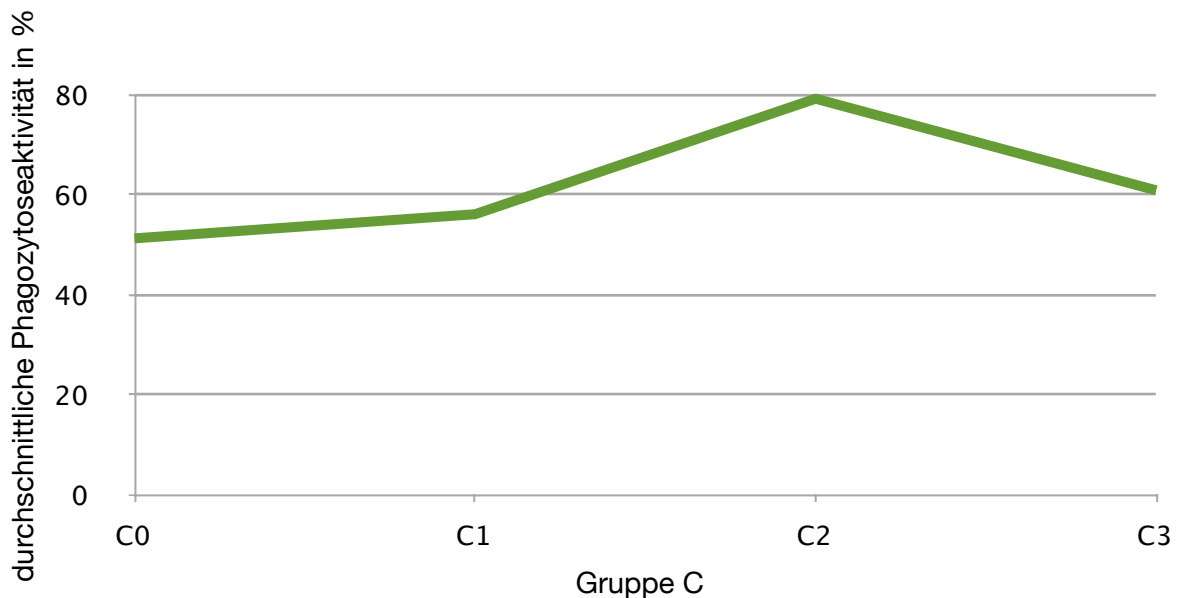


Abbildung 20: Mittelwerte der Phagozytoseaktivität: Gruppe C im Verlauf

## Gruppe B:

Eine Woche postoperativ kam es in Gruppe B zu einem Abfall der Phagozytoseaktivität von 63% auf 41,1%, dieser war jedoch statistisch nicht signifikant ( $p = 0,14$ ). Im Laufe der zweiten postoperativen Woche kam es zu einem statistisch signifikanten Anstieg auf 69,3% ( $p = 0,03$ ). Nach 3 Wochen fanden sich wiederum ähnlich Werte im Vergleich zu den Ausgangswerten ( $p = 0,54$ ) (Siehe Abbildung 21).



Abbildung 21: Mittelwerte der Phagozytoseaktivität: Gruppe B im Verlauf

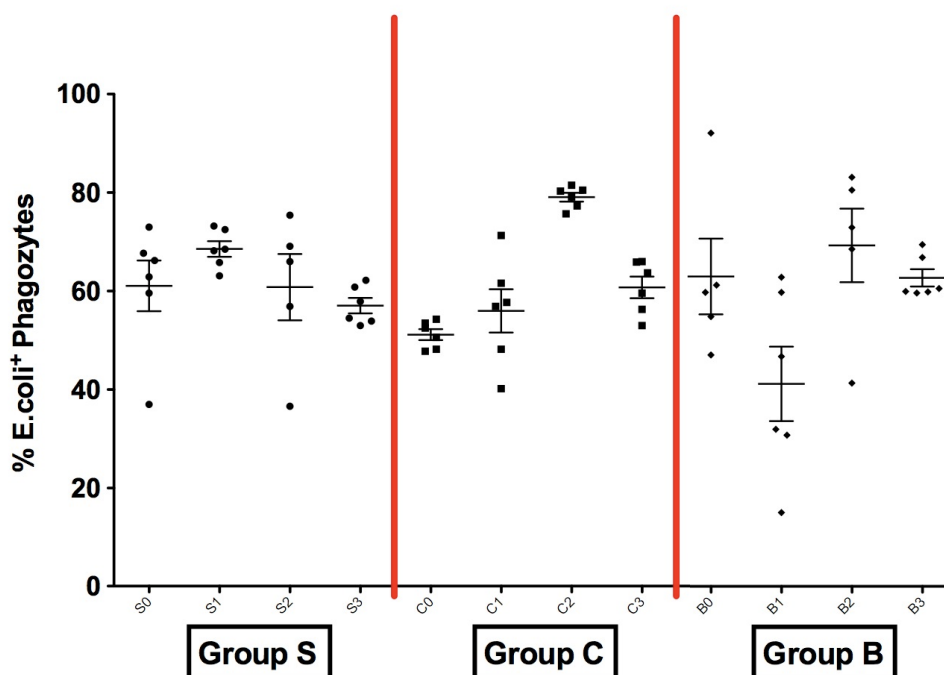


Abbildung 22: Vergleich der Phagozytoseaktivität innerhalb der einzelnen Studiengruppen über die Zeit

## 8 DISKUSSION

Wir haben in dieser Studie an 18 wachsenden Ratten gezeigt, dass das verwendete Implantatmaterial (PHB) keinen zusätzlichen Einfluss auf die Phagozytoseaktivität und das Immunsystem des sich entwickelnden Organismus hat. Im Vergleich zu den weitgehend gleichbleibenden Werten der Tiere ohne Intervention (Gruppe S) und den präoperativen Ausgangswerten, war in beiden anderen Gruppen ein deutlicher Anstieg der Phagozytoseaktivität erkennbar.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch von anderen Gruppen publiziert. Shishatskaya et al. (2004) zeigten im Rattenmodell, dass die Verwendung von Nahtmaterial aus reinem PHB keine unerwünschten Auswirkungen auf den Organismus hat (44). Xiang-Hua Qu et al. (2006) berichteten über lediglich milde Gewebereaktionen nach subkutaner Implantation von PHB - Partikeln in Hasen (45). Auch bei Gogolewski et al. (1993) führte die Implantation von PHB - Pins zu keinerlei unerwünschten Immunreaktionen im umgebenden Gewebe (26).

Dass gerade die üblichen nichtresorbierbaren Knochenimplantate aus Titan, Nickel, Kobalt, Chrom und ihren Legierungen ein hohes immunreaktives Potential haben, wurde mittlerweile in mehreren vergleichbaren Studien nachgewiesen. Die Komplikationen entstehen hauptsächlich durch Korrosion. Partikel oder lösliche Ionen werden durch Reibung und Gewebekontakt aus dem Implantat freigesetzt. Von diesen Abfallprodukten aktivierte Monozyten schütten vermehrt proinflammatorische Zytokine aus (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8) und führen zu einer Aktivitätsabnahme von Osteoblasten. Die Aktivität der Osteoklasten wird dadurch allerdings erhöht. Diese Mechanismen führen von Metallallergien und Hypersensitivitätsreaktionen bis hin zu Osteolysen und Prothesenlockerungen (46-48). PHB stellt also diesbezüglich eine gute Alternative dar.

Diese Studie zeigte einen nennenswerten Anstieg der Phagozytoseaktivität in der Kontrollgruppe C und der Gruppe mit dem Implantat (Gruppe B) verglichen mit den präoperativen Ausgangswerten und den homogenen Werten in der Gruppe ohne jegliche Intervention (Gruppe S). Zwischen den Gruppen C und B war kein signifikanter Unterschied erkennbar. Dadurch konnten wir zeigen, dass das verwendete Implantat keinen zusätzlichen Einfluss auf das Immunsystem hat. Für

den Anstieg der Phagozytoseaktivität waren also Operation und folgende Knochenheilung verantwortlich. Wie von Menger et al. (2004) beschrieben, werden in der Akutphase von Monozyten und Makrophagen am Eingriffsort proinflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sezerniert. Diese beiden Faktoren regen wiederum die Produktion weiterer Zytokine, wie beispielsweise IL-6, an. IL-6 ist ein besonders wichtiger Faktor für die Proliferation von neutrophilen Granulozyten im Knochenmark und steigert deren Aktivität. Diese frühe Immunreaktion ist außerdem durch unkontrollierten oxidativen Burst von Phagozyten gekennzeichnet. Aber auch für die darauf folgenden anti-inflammatorischen Kompensationsmechanismen zeigt sich IL-6 verantwortlich. Antientzündlich wirkende Mediatoren, wie Prostaglandin (PG) E<sub>2</sub>, IL-10 und Transforming Growth Factor (TGF)  $\beta$ , werden vermehrt ausgeschüttet und führen gegengleich zu einer Immunsuppression (49). Läuft die Reaktion auf ein Trauma optimal, halten sich die Entzündung in der Akutphase und die darauf folgende kompensatorische anti-inflammatorische Gegenregulation die Waage. Laut Mountziaris et al. (2008) hat die Knochenheilung einen ähnlichen Effekt auf die Bestandteile des Immunsystems. Auch hier laufen in der ersten Woche inflammatorische Vorgänge, basierend auf proinflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-1, IL-6) und TNF $\alpha$ , ab. Diese führen ebenfalls zu einem Anstieg der Phagozytenzahl und deren Aktivität (50).

Bei der Auswertung hat sich vor allem die Unterscheidung zwischen Monozyten und Granulozyten als problematisch erwiesen. Aufgrund ihrer ähnlichen Größe und Granularität und Mangels passenden Antikörpern zur Differenzierung mussten beide Zellpopulationen zusammengefasst ausgewertet werden. Die Phagozytoseleistung konnte folglich keiner einzelnen Zellart zugeordnet werden sondern war nur als Gesamtwert erkennbar. In Folgeexperimenten könnte die Aktivität der Phagozyten mit geeigneten Hilfsmitteln getrennt voneinander untersucht werden. Es ist allerdings fraglich, ob diese Untersuchung für einen weiteren Fortschritt überhaupt nötig ist.

## **9 SCHLUSSFOLGERUNG**

Um Kindern nach einer operativen Frakturversorgung einen belastenden Zweiteingriff zur Metallentfernung zu ersparen wäre es von Vorteil, nichtresorbierbare Implantate durch resorbierbare Osteosynthesematerialien zu ersetzen. Diese sollten neben Narkose und Operation das Immunsystem nicht zusätzlich belasten. In dieser Studie konnten wir zeigen, dass PHB diesen Anforderungen entspricht und daher insbesondere aus immunologischer Sicht ein vielversprechendes Implantatmaterial darstellt.

## LITERATURVERZEICHNIS

1. **Slongo TF.** The potential for bioresorbable implants in paediatric fractures. *Injury* 2002, Aug;33 Suppl 2:B84-7.
2. **Böstman OM.** Metallic or absorbable fracture fixation devices. A cost minimization analysis. *Clin Orthop Relat Res* 1996, Aug(329):233-9.
3. **Pietrzak WS, Sarver D, Verstynen M.** Bioresorbable implants--practical considerations. *Bone* 1996, Jul;19(1 Suppl):109S-19S.
4. **Witte F, Calliess T, Windhagen H.** [Biodegradable synthetic implant materials : Clinical applications and immunological aspects]. *Orthopäde* 2008, Feb;37(2):125-30.
5. **van der Elst M, Patka P, van der Werken C.** [Biodegradable implants in fracture fixation: State of the art]. *Unfallchirurg* 2000, Mar;103(3):178-82.
6. **Chaplin DD.** Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2010, Feb;125(2 Suppl 2):S3-23.
7. **Hörner C, Bouchon A, Bierhaus A, Nawroth PP, Martin E, Bardenheuer HJ, Weigand MA.** [Role of the innate immune response in sepsis]. *Anaesthesist* 2004, Jan;53(1):10-28.
8. **Murphy KP, Travers P, Walport M.** *Janeway Immunologie*. 7.Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009, S. 2-139.
9. **Medzhitov R, Janeway CA.** Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002, Apr 12;296(5566):298-300.
10. **Horn F, Moc K, Schneider N, Grillhösl C, Berghold S, Lindenmeier G.** *Biochemie des Menschen : Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 3. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2002, S. 577-82.
11. **Schütt C, Bröker B.** *Grundwissen Immunologie*. 1.Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2006, S. 2-3.
12. **Ferencik M, Rovensky J, Mat'ha V, Herold M.** *Kompodium der Immunologie : Grundlagen und Klinik*. 1. Auflage. Wien: Springer Verlag; 2006, S. 43-55.
13. **Böcker W, Denk A, Heitz PU, Moch H.** *Pathologie*. 4.Auflage. München: Urban&Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2008, S. 73-84.
14. **Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM.** *Roitt's essential immunology*. 12.Auflage. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell; 2011, S. 3-32.

- 15. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A.** Neutrophil function: From mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol* 2012;30:459-89.
- 16. Smith JA.** Neutrophils, host defense, and inflammation: A double-edged sword. *J Leukoc Biol* 1994, Dec;56(6):672-86.
- 17. Klinke R, Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S.** *Physiologie*. 6. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2010, S. 234-39.
- 18. Rasmussen SB, Reinert LS, Paludan SR.** Innate recognition of intracellular pathogens: Detection and activation of the first line of defense. *APMIS* 2009, May; 117(5-6):323-37.
- 19. Aderem A.** Phagocytosis and the inflammatory response. *J Infect Dis* 2003, Jun 15;187 Suppl 2:S340-5.
- 20. Babior BM.** The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest* 1984, Mar;73(3):599-601.
- 21. Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A.** Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 2000, Feb;12(1):64-76.
- 22. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC.** Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 1998, Nov 1;92(9): 3007-17.
- 23. Schinhammer M, Hänzi AC, Löffler JF, Uggowitzer PJ.** Design strategy for biodegradable fe-based alloys for medical applications. *Acta Biomater* 2010, May; 6(5):1705-13.
- 24. Staiger MP, Pietak AM, Huadmai J, Dias G.** Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review. *Biomaterials* 2006, Mar;27(9):1728-34.
- 25. Vert M, Schwach G, Engel R, Coudane J.** Something new in the field of PLA/GA bioresorbable polymers? *J Control Release* 1998, Apr 30;53(1-3):85-92.
- 26. Gogolewski S, Jovanovic M, Perren SM, Dillon JG, Hughes MK.** Tissue response and in vivo degradation of selected polyhydroxyacids: Polylactides (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/VA). *J Biomed Mater Res* 1993, Sep;27(9):1135-48.
- 27. Hope PG, Williamson DM, Coates CJ, Cole WG.** Biodegradable pin fixation of elbow fractures in children. A randomised trial. *J Bone Joint Surg Br* 1991, Nov; 73(6):965-8.

- 28. Eppley BL, Sadove AM, Havlik RJ.** Resorbable plate fixation in pediatric craniofacial surgery. *Plast Reconstr Surg* 1997, Jul;100(1):1-7; discussion 8-13.
- 29. Tegnander A, Engebretsen L, Bergh K, Eide E, Holen KJ, Iversen OJ.** Activation of the complement system and adverse effects of biodegradable pins of polylactic acid (biofix) in osteochondritis dissecans. *Acta Orthop Scand* 1994, Aug; 65(4):472-5.
- 30. Santavirta S, Konttinen YT, Saito T, Grönblad M, Partio E, Kemppinen P, Rokkanen P.** Immune response to polyglycolic acid implants. *J Bone Joint Surg Br* 1990, Jul;72(4):597-600.
- 31. Bergsma JE, de Bruijn WC, Rozema FR, Bos RR, Boering G.** Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws. *Biomaterials* 1995, Jan;16(1):25-31.
- 32. Böstman O, Pihlajamäki H.** Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: A review. *Biomaterials* 2000, Dec;21(24): 2615-21.
- 33. Nottelet B, Coudane J, Vert M.** Synthesis of an x-ray opaque biodegradable copolyester by chemical modification of poly (epsilon-caprolactone). *Biomaterials* 2006, Oct;27(28):4948-54.
- 34. Anderson AJ, Dawes EA.** Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev* 1990, Dec;54(4): 450-72.
- 35. Luzier WD.** Materials derived from biomass/biodegradable materials. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, Feb 1;89(3):839-42.
- 36. Navarro M, Michiardi A, Castaño O, Planell JA.** Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface* 2008, Oct 6;5(27):1137-58.
- 37. Koller M, Hesse P, Bona R, Kutschera C, Atlić A, Braunegg G.** Biosynthesis of high quality polyhydroxyalkanoate co-and terpolyesters for potential medical application by the archaeon *haloferax mediterranei*. *Macromolecular Symposia* 2007;253(1):33-9.
- 38. Williams DF.** On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008, Jul; 29(20):2941-53.
- 39. Eglin D, Alini M.** Degradable polymeric materials for osteosynthesis: Tutorial. *Eur Cell Mater* 2008;16:80-91.

- 40. Henze U, Zwadlo-Klarwasser G, Klosterhalfen B, Hocker H, Richter H, Mittermayer C.** Kunststoffe für den medizinischen Einsatz als Implantatmaterialien. Deutsches Ärzteblatt-Ärztliche Mitteilungen-Ausgabe A 1999;96(15):979-87.
- 41. Hoffmann R, Weller A, Helling HJ, Krettek C, Rehm KE.** [Local foreign body reactions to biodegradable implants. A classification]. Unfallchirurg 1997, Aug;100(8):658-66.
- 42. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT.** Foreign body reaction to biomaterials. Semin Immunol 2008, Apr;20(2):86-100.
- 43. Hirt W, Nebe T, Birr C.** [Phagotest and bursttest (phagoburst), test kits for study of phagocyte functions]. Wien Klin Wochenschr 1994;106(8):250-2.
- 44. Shishatskaya EI, Volova TG, Puzyr AP, Mogilnaya OA, Efremov SN.** Tissue response to the implantation of biodegradable polyhydroxyalkanoate sutures. J Mater Sci Mater Med 2004, Jun;15(6):719-28.
- 45. Qu XH, Wu Q, Zhang KY, Chen GQ.** In vivo studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) based polymers: Biodegradation and tissue reactions. Biomaterials 2006, Jul;27(19):3540-8.
- 46. Goodman SB.** Wear particles, periprosthetic osteolysis and the immune system. Biomaterials 2007, Dec;28(34):5044-8.
- 47. Huber M, Reinisch G, Trettenhahn G, Zweymüller K, Lintner F.** Presence of corrosion products and hypersensitivity-associated reactions in periprosthetic tissue after aseptic loosening of total hip replacements with metal bearing surfaces. Acta Biomater 2009, Jan;5(1):172-80.
- 48. Hallab NJ, Jacobs JJ.** Biologic effects of implant debris. Bull NYU Hosp Jt Dis 2009;67(2):182-8.
- 49. Menger MD, Vollmar B.** Surgical trauma: Hyperinflammation versus immunosuppression? Langenbecks Arch Surg 2004, Nov;389(6):475-84.
- 50. Mountziaris PM, Mikos AG.** Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. Tissue Eng Part B Rev 2008, Jun;14(2):179-86.

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Übersicht über die Immunzellentwicklung(6)</i> .....	6
<i>Abbildung 2: Ablauf der Phagozytose (12)</i> .....	7
<i>Abbildung 3: Phagozytose und oxidativer Burst (16)</i> .....	11
<i>Abbildung 4: Lokale Fremdkörperreaktion (42)</i> .....	15
<i>Abbildung 5: PHB-Pin</i> .....	17
<i>Abbildung 6: Narkoseeinleitung</i> .....	19
<i>Abbildung 7: Operationsablauf</i> .....	20
<i>Abbildung 8: Blutabnahme</i> .....	22
<i>Abbildung 9: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse</i> .....	25
<i>Abbildung 10: Übersicht über den Studienablauf</i> .....	27
<i>Abbildung 11: Auswertungsbeispiel Gruppe S</i> .....	29
<i>Abbildung 12: Auswertungsbeispiel Gruppe C</i> .....	30
<i>Abbildung 13: Auswertungsbeispiel Gruppe B</i> .....	31
<i>Abbildung 14: Mittelwerte zu Beginn der Studie</i> .....	32
<i>Abbildung 15: Mittelwerte 1 Woche postoperativ</i> .....	34
<i>Abbildung 16: Mittelwerte 2 Wochen postoperativ</i> .....	35
<i>Abbildung 17: Durchschnittswerte 3 Wochen postoperativ</i> .....	36
<i>Abbildung 18: Vergleich der einzelnen Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, die Balken stehen für statistisch signifikante Unterschiede entsprechend der One-way ANOVA 1 und 2 Wochen postoperativ</i> .....	37
<i>Abbildung 19: Mittelwerte der Phagozytoseaktivität: Gruppe S im Verlauf</i> .....	38
<i>Abbildung 20: Mittelwerte der Phagozytoseaktivität: Gruppe C im Verlauf</i> .....	38
<i>Abbildung 21: Mittelwerte der Phagozytoseaktivität: Gruppe B im Verlauf</i> .....	39
<i>Abbildung 22: Vergleich der Phagozytoseaktivität innerhalb der einzelnen Studiengruppen über die Zeit</i> .....	39

## TABELLENVERZEICHNIS

<b><i>Tabelle 1: Gruppeneinteilung der Versuchstiere.....</i></b>	<b><i>18</i></b>
<b><i>Tabelle 2: Zusammensetzung FDD-Narkoselösung.....</i></b>	<b><i>18</i></b>
<b><i>Tabelle 3: Zusammensetzung Antidot-Lösung.....</i></b>	<b><i>21</i></b>
<b><i>Tabelle 4: postoperative Schmerzmedikation s.c.....</i></b>	<b><i>21</i></b>
<b><i>Tabelle 5: postoperative Schmerzmedikation Trinkwasser.....</i></b>	<b><i>22</i></b>
<b><i>Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien Blutabnahmen.....</i></b>	<b><i>23</i></b>
<b><i>Tabelle 7: Deskriptive Statistik präoperativ.....</i></b>	<b><i>32</i></b>
<b><i>Tabelle 8: Deskriptive Statistik 1 Woche postoperativ.....</i></b>	<b><i>33</i></b>
<b><i>Tabelle 9: Deskriptive Statistik 2 Wochen postoperativ.....</i></b>	<b><i>35</i></b>
<b><i>Tabelle 10: Deskriptive Statistik 3 Wochen postoperativ bei Studienabschluss... </i></b>	<b><i>36</i></b>